



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE BUTIRATO DE SÓDIO NA DIGESTIBILIDADE, ACTIVIDADE FERMENTATIVA E MORFOLOGIA INTESTINAL DE LEITÕES DESMAMADOS.

Inês Serejo Pina Antunes Tonel

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia agrónómica – Agro-pecuária

Orientador: Doutor João Pedro Bengala Freire, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Co-orientador: Doutor Patrick Garres, NEAR, França.

Juri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: - Doutor João Pedro Bengala Freire, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

- Doutor Patrick Garres, NEAR, França

- Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Lisboa, 2009

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. João Pedro Bengala Freire, pela proposta do tema de dissertação de mestrado, bem como toda a sua disponibilidade e ajuda durante todas as etapas que conduziram à realização deste trabalho;
- Ao Dr. Patrick Garres, a possibilidade de realização do presente trabalho, bem como a sua disponibilidade;
- Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, na pessoa do Prof. Mário Pinho pela possibilidade de aí realizar parte do trabalho;
- Ao Sr. José António, pela ajuda indispensável e sempre incansável que esteve disposto a dar;
- Agradeço às técnicas D. Lúcia, D. Loures e D. Cesaltina por todo o apoio e companhia que me foram prestados aquando das etapas laboratoriais do trabalho;
- Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram e incentivaram ao longo destes anos.

Resumo

Trinta e seis leitões com 21 dias de idade foram utilizados para testar o efeito de duas fontes de butirato de sódio na digestibilidade, desenvolvimento do tubo digestivo, fermentação intestinal e morfologia da mucosa intestinal. Os leitões foram distribuídos por 3 regimes: RB (controle), A- RB + 0,5% butirato A, B- RB + 0,25% butirato B. As duas formas de butirato A e B doseiam 54% e 98% de ácido butírico respectivamente.

Verificou-se uma tendência para redução da consistência fecal com o butirato B. A digestibilidade fecal aparente da PB foi de 0,772; 0,790 e 0,838 para os regimes RB, A e B, respectivamente ($P < 0,05$). O peso do baço e do intestino delgado e grosso vazio foi reduzido com o butirato em especial com o butirato B. O teor de MS (%) dos conteúdos ileais foi de 6,67; 5,33 e 5,10, para os regimes RB, A e B, respectivamente ($P < 0,05$). No ceco a actividade da xilanase e da pectinase foi reduzida com o butirato de sódio. A altura das vilosidades ileais (μm) foi 295; 312 e 280 para os regimes RB, A e B, respectivamente ($P < 0,10$). O regime B aumentou a largura das vilosidades no jejuno.

Palavras-chave: leitões, butirato, desenvolvimento intestinal, morfologia intestinal, fermentação intestinal, digestibilidade.

Abstract

Thirty-six piglets of 21 days of age were used to test the effect of two sources of sodium butyrate on digestibility, development of the digestive tract, intestinal fermentation and morphology of the intestinal mucosa. The piglets were divided by 3 diets: RB (control), A - RB + butyrate 0.5% A, B - RB + 0.25% butyrate B. The two forms of butyrate A and B dosing 54% and 98% of butyric acid, respectively.

There was a tendency for reduction of faecal consistency with butyrate B. TTAD Crude Protein was 0.772, 0.790 and 0.838 for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.05$). The weight of the spleen and empty small and large intestine was reduced with butyrate in particular butyrate B. The content of DM (%) of the ileal content was 6.67, 5.33 and 5.10 for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.05$). In caecum the activity of xylanase and pectinase was reduced with sodium butyrate. The height of ileal villi (μm) was 295, 312 and 280 for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.10$). The diet B increased the width of the villi in the jejunum.

Keywords: piglets, butyrate, intestinal development, intestinal morphology, intestinal fermentation, digestibility.

Extended Abstract

The period after weaning is one of the most critical production stages in most pork production systems. This period is characterized by a lower feed intake, resulting in a decrease in average daily, and contributes greatly the onset of gastrointestinal diseases (Barnett et al., 1989). These problems were counteracted with widespread use of antibiotic, which led to the development of resistance by intestinal pathogens. These concerns culminated in the ban of the used of most antibiotics used as animal growth promoters. As consequence, there is an increasing need to find alternatives to modulate microflora and control intestinal fermentation. Among the alternatives are SCFA which play a role as energy sours butyric acid being the most readily oxidized to CO₂ among all the other SCFA in the intestine. Butyric acid was also shown to induce cell differentiation and to regulate the growth and proliferation of normal colonic and ileal mucosa (Treem et al., 1994).

To further understand the effects of butyrate when fed weaning piglets, we investigate in the current study how two sources of butyrate affect growth performance, development of the digestive tract, digestibility, intestinal fermentation and morphology of the intestinal mucosa Thirty six piglets, aged 21 days, were assigned to 3 different diets. Diet RB was a control regimen, diet A was supplemented with 0.50% of one source of butyrate which contained sodium, potassium and calcium salts of butyric acid (dosing 54% of butyric acid), and diet B contained 0.25% of another source of butyrate containing sodium salt of butyric acid (dosing 98% of butyric acid).

The effect of butyrate sources on growth performance was not significant. The inclusions of either sources of butyrate in piglet's diet significantly reduced the empty weight (g/kg) of the small and large intestine. Diet RB compared to diet A decreased the empty weight (g/kg) of the stomach and gallbladder. The weight of the spleen and empty small and large intestine was reduced with butyrate in particular B. The faecal consistency for diets RB, A and B were respectively 0.742, 0.689 and 0.447 ($P < 0.05$). TTAD DM was 0.816, 0.814 and 0.867 for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.10$). TTAD Crude Protein was 0.772, 0.790 and 0.838 for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.05$). TTAD ADF was 0.007, 0.068 and 0.290 for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.05$). DM of Ileal contents was 6.67, 5.33 and 5.10 % for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.05$). None of the butyrate sources had significant effect on DM level of ceacal or colon contents and pH values of stomach, ileum, caecum or colon contents. The activity of xylanase in the caecum (mg / ml) was 274.1, 208.1 and 218.0 for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.05$) and pectinase was 344.1, 261.8 and 237.0 for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.05$). The inclusion of either sources of butyrate in piglet's diet had no significant effect on ileal SCFA but significantly reduced the total SCFA level in the ceacum and colon. The ileal villus height was 295, 312 and 280 μm for diets RB, A and B, respectively ($P < 0.10$). Diets B, increased the villus width in jejunum. There were no significant effects on crypt depth of the mucosa in the duodenum, jejunum or ileum.

Concluding, the inclusion of sodium butyrate in the diet of piglets promoted a reduction of the weight of the intestine without affecting the intestinal villi. This effect was most notable in the regimen supplemented with sodium butyrate B.

The TTAD crude protein increased significantly with the introduction of sodium butyrate, particularly in the case of diet B. This contributed to a trend of increase in relation to dry matter. In short the use of sodium butyrate in the diets of weaning promoted an improvement in digestive utilization of food.

The sodium butyrate to increase the digestibility of the diets promoted a reduction of substrate reaching the large intestine. So will occur a decrease in fermentative activity in distal compartments of the digestive tract, reducing the activity of microbial enzymes and production of VFA.

Índice geral

Introdução.....	1
I - Revisão bibliográfica	
Capítulo 1. Fisiologia do aparelho digestivo do porco.....	2
1.1. Sistema digestivo.....	2
1.2. Morfologia do intestino delgado.....	3
1.3. Funções do intestino	4
1.3.1. Função imunitária do intestino	4
1.4. Importância da microflora intestinal	5
1.5. Problemática do pós-desmame	5
Capítulo 2. Processo digestivo dos principais componentes da dieta alimentar dos suínos	7
2.1. Compostos azotados: proteínas e aminoácidos	7
2.2. Lipídeos	7
2.3. Hidratos de carbono	7
Capítulo 3. Acidificantes	9
3.1. Problemática dos antibióticos	9
3.2. Objectivos a alcançar com os antibióticos	9
3.2.1. Como funcionam os ácidos promotores de crescimento	9
3.3. Tipos de acidificantes e suas formas de apresentação	10
3.4. Efeito de vários acidificantes no organismo do leitão	10
Capítulo 4. Butirato de sódio	12
4.1. Características do butirato de sódio	12
4.2. Objectivos a alcançar com recurso ao butirato de sódio	12
4.3. Efeito do butirato de sódio no pH dos compartimentos do tubo digestivo e nos seus conteúdos	12
4.4. Efeito do butirato de sódio na ingestão de alimento e nas performances zootécnicas	13
4.5. Efeito do butirato de sódio na digestibilidade, na actividade enzimática microbiana e na microflora intestinal	13
4.5.1. Efeito do butirato de sódio na digestibilidade dos alimentos	14
4.5.2. Efeito do butirato de sódio na produção de AGV	14
4.5.3. Efeito do butirato de sódio na microflora intestinal	15
4.6. Efeito do butirato de sódio na morfologia da mucosa intestinal	15
4.7. Efeito do BS no controlo das diarreias no pós-desmame	16

II – Material e Métodos

1. Animais	18
2. Regimes experimentais	19
3. Protocolo experimental	20
3.1. Preparação das amostras dos regimes alimentares, das fezes e das urinas	21
4. Análises	21
4.1. Determinação dos ácidos gordos voláteis	21
4.2. Determinação da actividade enzimática microbiana	22
4.3 Morfologia da mucosa intestinal dos leitões	22
4.4 Determinações analíticas a partir dos regimes alimentares, das fezes e da urina	22
4.5 Medição do pH dos conteúdos do tracto gastrointestinal	23
5. Cálculos	24
5.1. Performances de crescimento	24
5.2. Digestibilidade fecal aparente	24
5.3. Balanço azotado	25
6. Tratamento estatístico dos dados	25

III - Resultados

1. Performances de crescimento	26
2. Digestibilidade fecal aparente	26
3. Desenvolvimento do tracto gastrointestinal dos leitões em função do regime ingerido	29
4. Conteúdos do tracto gastrointestinal: determinação da matéria seca (MS) e do pH	30
5. Morfologia da mucosa intestinal	30
6. Actividade enzimática microbiana	31
7. Determinação dos ácidos gordos voláteis (AGV) nos conteúdos intestinais	32
8. Balanço azotado	34

IV - Discussão

1. Efeito do butirato de sódio no crescimento dos leitões e no desenvolvimento do tubo digestivo	36
2. Efeito do butirato de sódio na digestibilidade do regime	36
3. Efeito do butirato de sódio na actividade fermentativa	37
4. Efeito do butirato de sódio na morfologia intestinal.....	38

V- Conclusão	40
--------------------	----

Referências bibliográficas	41
----------------------------------	----

Índice de tabelas

Tabela 1. Efeito do desmame nos leitões (Lallès et al., 2004)	6
Tabela 2. Efeito de vários acidificantes nas performances zootécnicas, microrganismos e actividade microbiana, pH, morfologia intestinal e diarreias.....	11
Tabela 3. Composição (g/kg) dos regimes experimentais.....	18
Tabela 4. Composição química dos regimes experimentais	19
Tabela 5. Índice de consistência fecal e respectivo estado fecal	20
Tabela 6 - Efeito do butirato de sódio nas performances de crescimento e na consistência fecal de leitões das 3 às 8 semanas de idade	27
Tabela 7. Efeito do butirato de sódio na digestibilidade fecal aparente do regime	28
Tabela 8. Efeito do butirato de sódio no peso dos componentes do tracto gastrointestinal (g/kg de peso vivo)	29
Tabela 9. Efeito do butirato de sódio na matéria seca e no pH dos conteúdos do tracto gastrointestinal	30
Tabela 10. Efeito do butirato de sódio na morfologia da mucosa intestinal	31
Tabela 11. Efeito do butirato de sódio na actividade enzimática microbiana (mg/ml)	32
Tabela 12. Efeito do butirato de sódio nos AGV dos conteúdos ileais	33
Tabela 13. Efeito do butirato de sódio nos AGV dos conteúdos cecais	33
Tabela 14. Efeito do butirato de sódio nos AGV dos conteúdos do cólon	34
Tabela 15. Efeito do butirato de sódio no balanço azotado dos leitões	35

Índice de Ilustrações

Ilustração 1. Camadas do intestino delgado mostrando as vilosidades	3
Ilustração 2. Corte histológico (objectiva 10x) da mucosa intestinal	4
Ilustração 3. Fórmula molecular do butirato de sódio	12
Ilustração 4. Esquema do protocolo experimental	20

Lista de símbolos e abreviaturas.

ADF: Fibra ácido-detergente
ADL: Lenhina ácido-detergente
AGV: Ácidos gordos voláteis
ATP: Adenosina trifostato
AV: Altura das vilosidades
BS: Butirato de sódio
C2: Acetato
C3: Propionato
C4: Butirato
CH₄: Metano
CMV: Complexo Multi-vitaminico
CRN: Coeficiente de retenção Azotada
CUD: Coeficiente de utilização digestiva
CUPN: Coeficiente prático de utilização de azoto
DNSA: Ácido dinitro-salicílico
DRV: desvio padrão residual
GMD: Ganho médio diário
HC: Hidratos de carbono
IC: Índice de conversão
ISA: Instituto Superior de Agronomia
LIE: Linfocitos intrarepiteliais
MS: Matéria seca
N: Azoto
NDF: Fibra neutro-detergente
NRC: Nutrient Requisitionment of Swine
PB: proteína bruta
PC: Profundidade das criptas
PNA: Polissacáridos não amiláceos
PV: Peso vivo
RB: Regime base
SAS: Statistical analysis system

Introdução

A produção suína, nos últimos trinta anos, tem-se caracterizado por um crescente aumento de competitividade e pela procura de um maior benefício económico. Esta realidade tem conduzido à prática de um desmame cada vez mais precoce, leitões com 3 -4 semanas de idade ou mesmo mais novos são separados das porcas. Apesar do elevado progresso na formulação e na selecção de ingredientes para as rações dos leitões, na maior parte dos sistemas produtivos, o período que compreende as 5 – 8 semanas após o desmame continua a ser uma das fases mais críticas da produção suína. Um dos períodos mais problemáticos na vida dos suínos é o desmame devido à idade do animal bem como à drástica alteração da dieta alimentar (Odgaard, 2001). Juntamente com alterações ambientais e sociais, estes factores de stress conduzem a uma baixa ingestão de alimento com consequente redução do ganho médio diário, contribuindo para o desencadear de doenças intestinais (Barnett et al., 1989). Mesmo a fase de reagrupamento dos animais aquando da passagem das celas para as jaulas de pós-desmame, representa uma ameaça para o bem-estar dos leitões. Até há pouco tempo este problema era contornado com o uso generalizado de antibióticos que melhoravam de forma significativa as performances dos leitões através da diminuição dos efeitos nocivos da microflora intestinal (Visek, 1978). O seu uso recorrente conduziu ao aparecimento de resistências em patógenos intestinais nos suínos com a possibilidade de se generalizar ao Homem (Witte, 1998). Como consequência, a Comunidade Europeia no princípio de 2006 proibiu a utilização de antibióticos como aditivos alimentares em doses subterapêuticas (promotores de crescimento) tornando-se urgente encontrar alternativas seguras que modelem a microflora cecal e controlem a fermentação intestinal. Entre estas substâncias, encontram-se os ácidos orgânicos conhecidos por serem fortes inibidores do crescimento microbiano sendo portanto intencionalmente adicionados a muitos alimentos como conservantes (Knochel e Gould, 1995; Podolak et al., 1996). Tem sido relatado que a adição de ácidos orgânicos como o cítrico, fórmico, fumárico, láctico ou propiónico nas dietas de leitões, ajuda a superar problemas no período de pós-desmame (Falkowski and Aherne, 1984; Partanen and Mroz, 1999). Aliás, de entre as várias funções metabólicas, os ácidos gordos de cadeia curta são uma importante fonte de energia, sendo o ácido butírico (ácido gordo de cadeia curta intestinal) aquele que é mais prontamente oxidado para CO₂ (Falkowski and Aherne, 1984; Partanen and Mroz, 1999). O ácido butírico também se salientou pela indução da diferenciação celular e pela regulação do crescimento e da proliferação normal da mucosa do íleo e do cólon (Treem et al., 1994). O butirato de sódio (BS) demonstrou ter um efeito positivo na melhoria das performances dos leitões (Piva et al., 2002). Para aprofundar o conhecimento dos efeitos do butirato de sódio quando ingerido por leitões desmamados, neste estudo investigou-se o efeito de duas diferentes fontes de butirato no desenvolvimento do tubo digestivo, a matéria seca e o pH dos conteúdos intestinais, a morfologia da mucosa intestinal, na digestibilidade e na actividade fermentativa microbiana (AGV).

I – Revisão bibliográfica

Capítulo 1. Fisiologia do aparelho digestivo

Os suínos são animais monogástricos, com uma digestão principalmente enzimática e o seu tracto gastrointestinal tem como função principal transformar os alimentos ingeridos em nutrientes que podem ser posteriormente absorvidos e utilizados pelo organismo.

Esses alimentos são processados no interior do organismo por mecanismos que incluem: **ingestão, digestão, absorção e egestão**. O tubo digestivo estendesse-se da boca até ao ânus, o que permite uma digestão e uma absorção sequenciais, ao longo desse, com o aproveitamento dos alimentos.

O sistema digestivo tem como função básica o fornecimento de **nutrientes** (substâncias minerais, vitaminas, glícidos, lípidos e prótidos) necessários ao crescimento, regeneração e regulação celular, bem como à obtenção de energia. Os nutrientes resultam, na maior parte das situações, da **digestão extracelular** (digestão que ocorre no interior de cavidades digestivas separadas do meio interno). Este processo compreende todos os processos mecânicos e químicos (hidrólises) pelos quais as moléculas complexas dos alimentos são desdobradas, por catálise enzimática, em moléculas simples que podem ser absorvidas.

1.1. Sistema digestivo do porco

O aparelho digestivo do porco é constituído pelos seguintes órgãos: boca, língua, esófago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e recto. Compreendendo também as seguintes glândulas anexas: glândulas salivares, fígado e pâncreas.

Na **boca** inicia-se a digestão mecânica e química através da acção dos dentes e da saliva que é produzida nas glândulas salivares, que lubrifica e facilita a deglutição. A saliva contém α -amilase que provoca a hidrólise do amido. O bolo alimentar formado na boca, progride ao longo do esófago até ao estômago devido à acção de contracções involuntárias da parede (movimentos peristálticos).

O **estômago** no caso do porco é constituído por um único compartimento (**animal monogástrico**) que possui a capacidade de armazenar grande quantidade de alimento aquando de uma ingestão mais rápida, mas que ao mesmo tempo permite a passagem dos conteúdos lentamente para o duodeno (Low and Zebrowska, 1989). Neste compartimento existem glândulas produtoras de **ácido clorídrico**, que devido ao pH fortemente ácido, destroem as bactérias ingeridas. As **glândulas gástricas** que se encontram na parede do estômago produzem enzimas, que fazem parte dos sucos digestivos, tais como a pepsina e a lipase gástrica, mas que segundo Low and Zebrowska (1989), não possuem qualquer efeito na produção de monómeros. Neste compartimento também ocorre alguma actividade fermentativa que pode ser detectada pela presença de ácido láctico e de ácidos gordos voláteis no digesta (Bach Knudsen, 2001). É neste compartimento que se inicia verdadeiramente o processo de digestão, com a formação do **quimo**.

O **intestino delgado** mede cerca de 18m de comprimento e é dividido em duodeno (que comunica com o estômago), jejuno e íleo. Este compartimento possui duas funções distintas; a

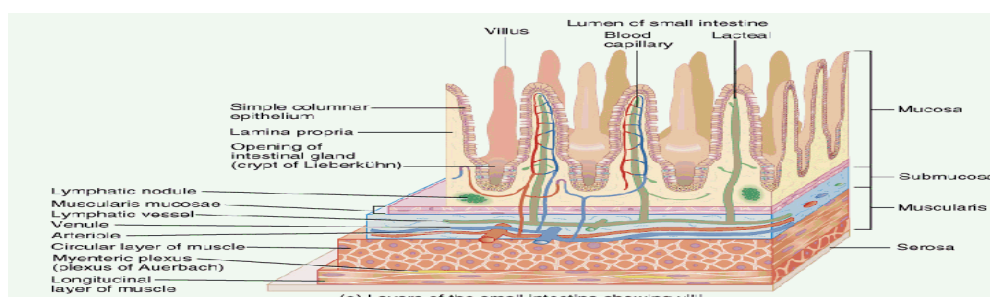
secreção e a absorção. Nas paredes intestinais existem glândulas que segregam enzimas, que juntamente com as **enzimas** provenientes do pâncreas, vão desdobrar as moléculas nos seus constituintes mais elementares, para depois poderem ser absorvidos pelas paredes intestinais que possuem **vilosidades** que aumentam de forma significativa a área dessa superfície. A absorção faz-se quer por transporte passivo, a favor do gradiente de concentração, quer por transporte activo, contra o gradiente de concentração. É neste compartimento que se forma o **quilo**. Os produtos resultantes da digestão dos lípidos e as vitaminas lipossolúveis são absorvidos para a linfa, as restantes substâncias seguem a via sanguínea.

O **intestino grosso** é uma região de absorção de água e concentração de resíduos e tem especial importância na digestão da fibra através de processos fermentativos (Bach Knudsen, 2001). No porco o intestino grosso está dividido em ceco e cólon.

1.2. Morfologia do intestino delgado e do intestino grosso

Como se pode verificar na Ilustração 1 e 2, na parede intestinal podem-se distinguir as seguintes camadas: serosa, muscular mucosa, sub-mucosa e mucosa. A **serosa** é uma túnica envolvente do intestino, é formada por tecido conjuntivo fibroso e epitelial. A **muscular mucosa** é constituída por duas camadas de fibras musculares lisas com orientações diferentes (fibras musculares longitudinais e fibras musculares circulares) que permitem os movimentos peristálticos e promovem a passagem dos compostos ao longo do intestino. A **sub-mucosa** é uma túnica que contém nervos e vasos sanguíneos e linfáticos que constituem **lâmina própria**. Esta camada apresenta dobras que constituem as **válvulas coniventes** e que são revestidas pelas vilosidades aumentando 10-14 vezes a superfície de contacto intestinal. A **mucosa** é uma túnica interna, produtora de **muco** em células isoladas ou glândulas. O muco é constituído por glicoconjugados e por mucina intestinal (substância que se forma nas glândulas mucosas e dá ao muco uma consistência viscosa) (Forstner et al., 1994), encontrando-se localizado na superfície celular do epitélio intestinal. Nesta região é possível observar projecções em forma de dedo de luva, que constituem as **vilosidades intestinais**. A base das vilosidades possui uma estrutura glandular, denominada **criptas** ou **glândulas de Lieberkühn** que constituem invaginações para o interior da mucosa. As vilosidades e as criptas são revestidas por células epiteliais denominadas enterócitos. Cada enterócito tem 2 tipos diferentes de células membranares. A parte desta voltada para o lúmen é coberta pela membrana apical que contém as **microvilosidades**.

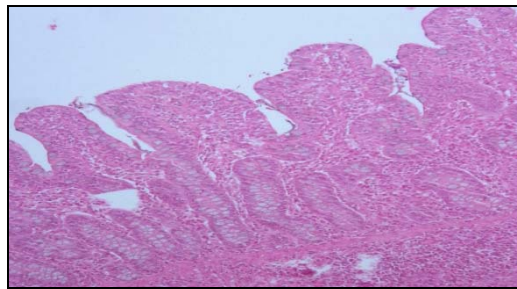
Ilustração 3. Parede do intestino delgado mostrando as vilosidades.



Cobrindo a membrana apical e encerrando as microvilosidades encontra-se uma camada gelatinosa de glicoproteínas conhecida por glicocalix. Algumas enzimas digestivas importantes e outras proteínas encontram-se ligadas às microvilosidades. As restantes células membranares dos enterócitos formam a denominada membrana basolateral que serve de intermediário entre a membrana apical e a corrente sanguínea, isto é os nutrientes são absorvidos para os enterócitos através da membrana apical e saem da célula através da membrana basolateral antes de acederem à corrente sanguínea. A ligação entre os enterócitos adjacentes é especialmente importante nos processos de digestão e de absorção por permitirem a passagem da água e dos pequenos electrólitos, mas não a passagem das moléculas orgânicas. As **células de goblet** encontram-se disseminadas entre os enterócitos e segregam muco que forma uma camada que cobre a mucosa. Na superfície das vilosidades o muco mistura-se no glicocalix formando uma camada viscosa que agarra as moléculas próximas da membrana apical.

Morfológicamente a parede do intestino delgado e do intestino grosso apresentam algumas diferenças. O intestino grosso não apresenta vilosidades, possui folículos linfóides.

Ilustração 4. Corte histológico (objectiva 10x) da mucosa intestinal.



1.3. Funções do intestino

Para além de participar no processo digestivo, o intestino delgado possui várias outras funções, tais como: a absorção de nutrientes, absorção e secreção de electrólitos (e água), secreção de mucinas e imunoglobinas, e ainda funciona como uma barreira de protecção selectiva contra a entrada de antígenos e patógenos nocivos para o organismo do animal. Alguns destes patógenos pertencem ao género dos *Bacteroides*, *Clostridia*, *Eubacteria*, *Enterobacteria* e *Enterococci* (Macfarlane et al., 2006).

1.3.1 Função imunitária do intestino

O epitélio intestinal constitui uma linha de defesa contra agentes patogénicos e agentes exteriores nocivos. A barreira criada pela mucosa pode ser destruída por várias doenças e por vários agentes patogénicos permitindo a passagem indiscriminada de antígenos para a lâmina própria através das juntas epiteliais. O **muco** contribui para a defesa celular, criando uma barreira física e prevenindo a adesão de bactérias através dos glicoconjugados. Outro mecanismo de defesa contra

as substâncias tóxicas e contra os microrganismos é da responsabilidade de proteínas produzidas pelas células da mucosa intestinal, tais como as proteínas “trefoil” (Macfarlane et al., 2006) e defensoras (Zhang et al., 2000). A mucina contribui em muito para a saúde do intestino através da lubrificação, da protecção físico-química e da prevenção da adesão das bactérias (Forstner et al., 1994). As células acídicas têm uma densidade mais elevada nas vilosidades e mais baixa nas criptas do que as células neutrais.

1.4. Importância da microflora intestinal

Todos os compostos que não são completamente digeridos e absorvidos, chegam ao intestino grosso. Este compartimento caracteriza-se por uma elevada actividade fermentativa, da responsabilidade da microflora intestinal, embora esta já tenha sido iniciada na parte terminal do intestino delgado (íleo). A microflora intestinal é essencialmente composta por bactérias, em especial do género *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*, produzindo enzimas que têm a capacidade de hidrolisar várias macromoléculas, originando entre outros produtos, gás e ácidos gordos voláteis (AGV); **butírico**, **propiónico** e **acético** (Grieshop et al., 2001); que são uma fonte energética de excelência para as células intestinais do porco (Bergman, 1990). Os efeitos dos AGV são variados. O **ácido acético** é o principal produto resultante da degradação da celulose e da pectina, sendo utilizado por muitos tecidos para a recuperação de energia a partir de hidratos de carbono não digeridos e não absorvidos no intestino delgado. Depois de absorvido chega à circulação sistémica e é metabolizado pelos músculos, rins, coração e cérebro. O **ácido butírico**, que provem essencialmente da fermentação do amido, induz efeitos diversos sobre o cólon; estimula o desenvolvimento da mucosa, fornece 70% da energia utilizada pelos colonócitos (Roediger, 1980) e regula a diferenciação e o crescimento celulares. É consumido quase completamente pela mucosa do cólon. O **ácido propiónico** está envolvido no metabolismo hepático dos lípidos e da glicose. É metabolizado no fígado e entra na circulação (Demigne and Morand, 1990). A concentração dos AGVs produzidos no cólon está numa razão de aproximadamente 60% de acetato, 25% de propionato e 15% de butirato. Os AGVs melhoram a absorção de cálcio ao nível do cólon e são absorvidos para o interior das células do cólon juntamente com o sódio e o cloro. Aquando da ocorrência de diarreias, pode haver perdas fecais consideráveis de água, sódio e potássio, devido à aceleração exagerada do trânsito intestinal, que dificulta a absorção de electrólitos. Portanto, a prevenção da diarreia é importante para a manutenção da saúde e da boa hidratação do animal.

1.5. Problemática do pós-desmame

O desmame é o período mais crítico da vida do porco, devido ao aumento da susceptibilidade a problemas intestinais, infecções e diarreias. Este período caracteriza-se por um complexo fisiológico, social, ambiental e stress dietético que interfere com o desenvolvimento e adaptação do intestino (**Tabela 1**). O desmame tem como efeito imediato uma redução do alimento (energia) ingerido conduzindo a um estado de subnutrição e um período de diminuição do crescimento. As alterações

intestinais mais frequentes neste período incluem modificações na morfologia das vilosidades/criptas e na actividade das enzimas no rebordo das vilosidades, bem como, implicações nos patógenos entéricos (*Escherichia coli* e rotovírus) (Pluske et al., 1997) que diminuem a actividade das enzimas digestivas no intestino (Mroz et al., 2003). Inicialmente foi considerado que o tecido intestinal danificado se devia a uma reacção de hipersensibilidade imunitária mediada (Dréau et al., 1999; Lallès et al., 1994; Stockes et al., 1987).

Tabela 3. Efeito do desmame nos leitões (Lallès et al., 2004).

Desmame = imaturidade + stress

- Imaturidade
 - comportamental (geral e alimentar)
 - intestinal (secreção, mobilidade, digestão, absorção, defesa, etc.)
 - imunitária (intestinal e geral)
- Stress psicológico devido
 - separação abrupta da mãe
 - mistura com outros leitões provenientes de outros compartimentos
 - novo ambiente (espaço ou quinta)
- Stress alimentar devido
 - retirada do leite (líquido, de elevada palpalidade e digestibilidade)
 - acesso alimento seco (sólido, menos palatável e digestível)
 - acesso separado à água

Indução de algumas desordens intestinais

- Alterações na arquitectura e nas funções intestinais
 - morfologicamente: atrofia das vilosidades seguida de uma hiperplasia das criptas
 - redução da actividade das enzimas digestivas intestinais
 - distúrbios intestinais quanto à absorção, secreção e permeabilidade
- Associadas a patógenos entéricos
 - bactérias (*Escherichia coli*., enterotoxigénicos e enteropatogénicos)
 - vírus: rotovírus

Factores de risco

- Factores de risco alimentar
 - baixa ou inconstante ingestão de alimento
 - presença de factores antinutricionais
 - dietas com componentes de elevada complexidade e baixa digestibilidade (proteínas, hidratos de carbono)
 - elevada nível proteico (elevada capacidade de amortecimento)
 - Factores de risco no manejo
 - ninhadas de grande dimensão/pouco peso ao desmame
 - elevada densidade de leitões no pós-desmame
 - baixos níveis de higiene
 - meio pouco adaptado às necessidades dos leitões (baixa temperatura, fraca qualidade do ar, etc.)
-

Capítulo 2. Processo digestivo dos principais componentes da dieta alimentar dos suínos

2.1. Compostos azotados: proteínas e aminoácidos

Os compostos azotados da dieta englobam na sua maioria proteínas e aminoácidos. No entanto também existe um grupo minoritário de compostos azotados não proteicos tais como aminas, amidas, amoníaco, nitratos, alcalóides, ácido úrico, vitaminas do complexo B, purinas e pirimidinas. A digestão das proteínas começa no estômago, onde são desnaturadas e parcialmente hidrolisadas (obtendo-se péptidos de elevado peso molecular), mediante a acção do ácido clorídrico e das enzimas gástricas (pepsina). No intestino delgado, mediante a acção das enzimas pancreáticas (tripsina e quimiotripsina), os polipéptidos são hidrolisados obtendo-se aminoácidos livres e dipéptidos. Estes produtos vão ser absorvidos por meio de transporte activo (Levin, 1994; Ferraris et al., 1990), tanto no jejuno como no íleo (Banks, 1993), ou processados por bactérias intestinais, sendo uma fonte de azoto. Apesar do facto da degradação proteica começar nos troços proximais do tracto digestivo, uma parte destes componentes (restos de aminoácidos, péptidos, proteínas desnaturadas) vai chegar à parte posterior do tracto gastrointestinal, onde o microbiota intestinal irá fermentar estas moléculas desaminando-as em amónio e cadeias carbonadas originando estas últimas ácidos gordos voláteis (AGV). A partir da fermentação de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) formam-se ácidos gordos ramificados (Macfarlane et al., 1992), ao mesmo tempo que se produzem diferentes produtos tóxicos como o amoníaco, as aminas e os fenóis que vão prejudicar a mucosa intestinal.

2.2. Lípidos

As gorduras e os óleos incluem-se na dieta em níveis variáveis (4-10%) e são importantes devido ao seu elevado valor energético. Os lípidos estão compostos por uma ampla gama de substâncias: ácidos gordos, acilglicéridos, fosfolípidos, glicolípidos, colesterol e ceras. No intestino delgado, os lípidos são emulsionados por acção dos sais biliares são digeridos pelas lipases pancreáticas, colipases e lipases que se encontram nas microvilosidades intestinais (Tso, 1994). A hidrólise do triacilglicerol, catalizada pela lipase pancreática, é indirecta e positivamente influenciada pelo aumento da superfície de contacto promovida pela acção dos sais biliares (Tso, 1994; Drackley, 2001). O grau de digestibilidade dos diferentes lípidos dependerá do tipo de gordura e do grau de saturação (Veum, 1991).

2.3. Hidratos de carbono (HC)

Os hidratos de carbono são os ingredientes utilizados em maior proporção na alimentação dos suínos (Bach Knudsen and Jorgensen, 2001). Neste grupo encontram-se substratos muito heterogéneos que podem diferir tanto na sua composição como no tipo de ligação glucosídica, como no seu tamanho. O amido é a maior fonte de polissacáridos de reserva existente nas plantas e representa a maior fonte de HC da dieta dos suínos (Björck, 1996). É geralmente bem digerido e

absorvido no intestino delgado. No entanto uma certa quantidade de amido pode resistir à degradação (amido resistente) e alcançar a parte terminal do intestino. Aquando da degradação os açúcares simples (monossacáridos, dissacáridos) vão ser absorvidos directamente através da mucosa intestinal ou vão ser digeridos por acção das enzimas endógenas excretadas na parte proximal do tracto gastrointestinal. Os polissacáridos mais complexos vão ser fermentados por bactérias que habitam no intestino grosso. Portanto os hidratos de carbono podem ser classificados em; digeridos por acção das enzimas endógenas (açúcares e parte do amido) e HC não digeríveis por acção enzimática. A fibra dietética é formada pelos polissacáridos que não são degradáveis pelas enzimas endógenas e engloba os polissacáridos não amiláceos (PNA) solúveis, PNA insolúveis, oligossacáridos não digeríveis, amido resistente e lenhina (Trowell et al., 1976), que vão sofrer fermentações (Montagne et al., 2003) dependendo estas da solubilidade, do grau de lenhificação e do tamanho das partículas (Cummings, 1982). A fibra dietética tem uma acção abrasiva promovendo a descamação da mucosa intestinal, bem como o aumento da viscosidade do digesta (tal depende do tipo de fibra), dificultando a interacção entre a proteína dietética e as enzimas digestíveis (Chesson, 1993; Nyachoti et al., 1997a; Drochner et al., 2004), reduzindo assim a capacidade de absorção por parte do intestino, bem como a quantidade de proteína passível de ser absorvida.

A digestão dos HC começa na cavidade oral onde os alimentos são triturados e misturados com a saliva (Argenzio, 1993) que contem enzimas como a α -amilase que vai digerir parte dos HC. Na parte proximal do intestino delgado, o digesta mistura-se com os sais biliares e com as secreções pancreáticas. Mediante a acção da amilase pancreática, parte do amido vai ser hidrolisado. Os produtos obtidos pela hidrólise dos HC vão ser absorvidos na sua maioria através da mucosa intestinal na forma de glucose, galactose ou frutose.

Todas as macromoléculas que não foram digeridas, nos troços proximais do tracto digestivo, chegam ao intestino grosso, onde vão ser hidrolisadas mediante a acção de diferentes hidrolases bacterianas como a xilanase, celulase, peptinase, etc, originando açúcares. Posteriormente, os produtos da hidrólise vão ser fermentados pelo microbiota intestinal com formação de AGV. Hidratos de carbono como a celulose ou os β -glucanos, vão chegar ao segmento ileal do intestino delgado sem sofrer nenhuma hidrólise prévia visto que a capacidade amilolítica da α -amilase é limitada, rompendo unicamente as ligações do tipo α e não afectando as ligações β . Através da fermentação dos HC geram-se uma série de produtos intermédios como o lactato e o succinato. Estes produtos vão ser metabolizados dando lugar à formação de AGV e a diferentes gases (hidrogénio, CO_2 e metano) como produtos finais da fermentação. Os AGV depois de absorvidos através do epitélio do cólon são incorporados em diferentes vias metabólicas podendo cobrir cerca de 25% das necessidades energéticas de conservação do porco (Bergman, 1990) A extensão da actividade fibrolítica depende do tipo de fibra ingerido e da quantidade de microrganismos existentes. Por outro lado quantidades crescentes de fibras dietéticas vão fomentar a passagem do N da urina para as fezes (Canh et al., 1997).

Em suma o metabolismo energético microbiano produz: ATP, AGV, CO_2 e CH_4 . A quantificação destes produtos pode correlacionar-se com a actividade microbiana/metabólica que tem lugar no intestino. A proporção dos diferentes AGVs vai depender do tipo de substrato fermentado e

do local de fermentação (Martin et al., 2000; Cummings and Macfarlane, 1991), sendo absorvidos continuamente à medida que são produzidos. Por exemplo, foi verificado um incremento das concentrações de ácido butírico e propiónico em paralelo com uma maior actividade amilolítica (Duncan et al., 2003). Também foram correlacionados aumentos nas concentrações totais de AGVs com uma maior actividade de bactérias lácticas (Jiang and Savaiano, 1997).

Capítulo 3. Acidificantes

3.1. Problemática dos antibióticos e alternativas

O desmame precoce dos leitões provoca consequências adversas no seu crescimento e bem-estar (Pluske et al., 1997), é frequentemente associado com doenças infecciosas e diarreias. A enterotoxigenica *Escherichia coli* é o agente mais comum responsável pelas doenças entéricas nos leitões sendo responsável pela elevada mortalidade anual (Hampson, 1994). A terapêutica e o uso de antibióticos promotores de crescimento revelaram-se eficazes na melhoria das performances dos suínos, através de um decréscimo da acção do microbiota (Visek, 1978). Ao longo das últimas décadas tem-se recorrido aos antibióticos para reduzir as infecções patogénicas, mas muitas bactérias tornaram-se resistentes. A Comunidade Europeia no princípio de 2006 proibiu a utilização de antibióticos como aditivos alimentares em doses sub-terapêuticas (promotores de crescimento) tornando-se urgente encontrar alternativas. Compostos como; acidificantes (ácidos orgânicos ou inorgânicos), probióticos e sais de zinco, têm sido estudados como alternativa aos antibióticos, mas apesar de terem oferecido resultados promissores, estes são pouco consistentes.

3.2. Objectivos a alcançar com o recurso a acidificantes

Como todos os compostos alternativos aos antibióticos, os acidificantes devem proteger as células contra o ataque de patogénios através de uma série de mecanismos; incluindo a inibição da adesão e da invasão por parte destes, interferência com o caminho de sinalização das bactérias patogénicas, manutenção do citoesqueleto das células epiteliais e da estrutura das juntas e modulação da resposta imunitária do hospedeiro.

3.2.1. Como funcionam os ácidos promotores de crescimento

O modo de acção dos acidificantes nos alimentos permanece ainda um assunto muito discutido no contexto mundial. É certo que, o único ponto no qual os investigadores estão de acordo, é que os efeitos benéficos de acidificar uma dieta para monogástricos não podem ser atribuídos simplesmente a uma redução de pH. Certos investigadores propuseram que incorporar vários ácidos às dietas de suínos no pós-desmame resultaram em melhorias na eficiência do uso da ração até 20%. No entanto, propuseram-se várias explicações prováveis, variando desde um aumento na acidez no estômago, que se poderia dizer que ajudaria na degradação da proteína, e, até mesmo, uma influência no controlo de crescimento de bactérias ou fungos. Vários outros investigadores têm

sugerido que as propriedades promotoras de crescimento podem ser devidas ao facto do acidificante; tornar os nutrientes mais digestíveis, melhorar o metabolismo, ou ainda alterar a composição da flora bacteriana que ocupa o trato gastrointestinal. No entanto é necessário algum cuidado na utilização de acidificantes, uma vez que há indicações de desenvolvimento de algumas resistências aos ácidos por parte de *S.typhimurium* e *E.coli* depois de expostos a ácidos gordos de cadeia longa (Uzzau et al., 2000).

3.3. Tipos de acidificantes e suas formas de apresentação

Os acidificantes podem ser **ácidos orgânicos** ou **inorgânicos**. A maioria dos estudos feitos tem utilizado os ácidos fórmico, propiónico, láctico, cítrico, ou os sais correspondentes. Os acidificantes podem ser utilizados **individualmente** ou numa **mistura** (poderá ser mais benéfica do que uma dieta suplementada com apenas um ácido, porque o seu espectro de actividade é muito mais alargado). Por outro lado também se podem encontrar **livres** ou **protegidos**. Uma das formas de protecção é a **microencapsulação**, esta técnica permite reduzir a dose de ácidos a ser incluída na dieta, mantendo o mesmo efeito que uma dose elevada (Piva et al., 2007). Os acidificantes na sua **forma indissociada**, têm a capacidade de atravessar a membrana e de serem absorvidos no intestino delgado, mas apenas poderão chegar ao intestino grosso, se sofrerem uma microencapsulação (Piva et al., 1997). Uma redução drástica do pH dos compartimentos digestivos poderá danificar a parede dos mesmos. Mazzoni et al. (2004), verificaram que ao introduzir na alimentação dos leitões **formato de cálcio encapsulado**, não ocorreu redução do número de células parietais gástricas, não se tendo verificado o mesmo quando se suplementou com igual quantidade de **formato de cálcio livre**.

3.4. Efeito de vários acidificantes no organismo do leitão

Apesar dos objectivos a alcançar com os diferentes acidificantes serem os mesmos, o efeito ao nível do organismo do animal vai depender de vários factores, entre os quais do tipo de acidificante utilizado, pois cada um tem a sua fórmula e o seu grau de acidificação. Na **tabela 2**, apresenta-se um estudo comparativo entre o **ácido benzóico**, **ácido glicónico**, **ácido fórmico**, **formato de cálcio livre**, **formato de cálcio protegido** e **ácido hidrocarboxílico** tendo em conta diferentes parâmetros. Como se pode verificar, de uma forma geral os acidificantes acima referidos têm um efeito positivo nos vários parâmetros das performances zootécnicas. Quanto aos parâmetros que avaliam os microrganismos e a sua actividade, os resultados obtidos para os diferentes acidificantes são bastantes díspares. De uma forma geral, os acidificantes promovem uma redução na população bacteriana. Todos demonstraram um efeito positivo na fermentação e na consequente produção de ácidos gordos voláteis. A morfologia intestinal foi beneficiada com a sua introdução nas rações para leitões, que se traduz por um aumento da altura das vilosidades. Um dos problemas inerentes ao pós-desmame é a ocorrência de diarreias; a introdução destes acidificantes nos regimes dos leitões promoveu a redução da sua incidência.

Tabela 4. Efeito de vários acidificantes nas performances zootécnicas, digestibilidade da proteína bruta, microrganismos e actividade microbiana, pH, morfologia intestinal e diarreias.

		Ácido benzóico	Ácido glucónico	Ácido fórmico	Formato de cálcio livre	Formato de cálcio protegido	Ácido hidrocarboxílico	Butirato de sódio
Idade / peso dos animais (inicial-final)		4 sem - 12 sem	4 sem – 10 sem	28Kg – 113,5 Kg	27 Kg – 99 Kg	27 Kg – 99 Kg		4 sem – 11 sem
Performances zootécnicas	Performances de crescimento	↑ (16) (10)	↑ (3)	↑ (14)	↑↑ (6)	↑ (6)		↑ (15)
	Ganho médio diário	↑ (16) (10)		↑ (14) (12)				
	Índice de conversão	↑ (16) (10) (13)		↑ (14) (12)				↓ (15)
Digestibilidade da proteína bruta		↑ (16) (10)	↓ (9)				↑ (1)	↑ (3)
Microrganismos e actividade microbiana	Biodiversidade Intestinal	↑ (16)		↓ (7)				↑ (18)
	Bactérias lácticas	↓ (10)	↑ (3)	↓ (7)				0 (3)
	População Microbiana	↓ (10)		↓ (8)	↓ (5)	↓ (5)		0 (3)
	Microrganismos patogénicos	↓ (10)			↓ (6) (5)	↓ (6) (5)	↓ (1)	0 (3)
	AGV	↑ (10)	↑ (3)	↑ (7)				↓ (3)
	Fermentação		↑ (2)	↑ (7) (a)				
	Concentração de amónia		↓ (3)				↓ (1)	
pH				↓ (17)				0 (3)
Morfologia intestinal	Altura das vilosidades	↑ (10)	↑ (17) 0 (3)		↑ (6)	↑ (6)		0 (3)
Saúde intestinal	Frequência de diarreias	▼ (10)	▼ (3)	▼ (8)	▼ (11)	▼ (11)		

Legenda

↑ : efeito positivo
↓ : efeito negativo
▼ : redução

(1) Adams et al.(1999)
(2) Asano et al. (1994)
(3) Biagi et al. (2006)
(4) Biagi et al. (2007)
(5) Bosi, et al. (2004)

(6) Canibe et al. (2001)
(7) Canibe et al. (2005)
(8) Canibe et al. (2009)
(9) Cranwell e Moughen (1989)
(10) Gugganbuhl et al. (2007)

(11) Mazzoni et al. (2004)
(12) Overland et al. (2000)
(13) Overland et al. (2007)
(14) Partanen et al. (1999)
(15) Piva et al. (2002)

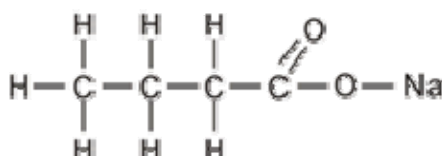
(16) Torrellardona et al. (2007)
(17) Walsh et al. (2007)
(18) Castillo et al. (2006)

Capítulo 4. Butirato de sódio

4.1. Características do butirato de sódio

O butirato de sódio (BS) tem como fórmula molecular, $C_4H_7O_2Na$ (Ilustração 3). É um sal derivado do ácido butírico e que portanto funciona e actua como um acidificante. É muitas vezes utilizado como substituto do ácido butírico, uma vez que é sólido, estável e tem um odor muito menos intenso. Este acidificante pode ser utilizado na sua forma livre ou na sua forma protegida (microencapsulada). O butirato microencapsulado influenciará a parte posterior do tracto gastrointestinal (Van Immerseel et al., 2004), enquanto que este composto ao não ser protegido, apenas afectará directamente a parte proximal do tracto digestivo (Bolton and Dewar, 1965; Hume et al., 1993; Thompson and Hinton, 1997). Como o BS é rapidamente absorvido, é uma fonte de energia tornada disponível para os colonócitos. A parte remanescente fica disponível para a fermentação bacteriana.

Ilustração 3. Fórmula molecular do butirato de sódio.



4.2. Objectivos a alcançar com o recurso ao butirato de sódio

O BS tem uma importante função reguladora relativamente à proliferação e diferenciação celular (Sengupta et al., 2006). O BS tem também um papel importante na promoção da absorção de água e de sódio (Bond et al., 1976). Finalmente modula a microflora intestinal (Gálfi et al., 1990; Castillo et al., 2006), dependendo a sua acção da adaptação bacteriana a variações da acidez no quimo (Mroz et al., 2006).

4.3. Efeito do butirato de sódio no pH dos compartimentos do tubo digestivo e nos seus conteúdos

O ácido clorídrico secretado pelo estômago; actua como uma molécula antimicrobiana e contribui para a barreira intestinal contra os patogénios. No entanto, ao desmame essa acidificação natural é reduzida após a interrupção da ingestão de leite. Depois do primeiro contacto com a dieta pré-starter, a secreção ácida aumenta insipidamente, mas as fontes minerais de alta qualidade utilizadas para cobrir as necessidades dos jovens leitões, têm um elevado poder tampão (Bolduan et al., 1988). Adicionar substâncias acidificantes ao alimento promoverá uma descida do pH na parte proximal do estômago tendo contudo um efeito de menor amplitude na parte distal do mesmo (Hansen et al., 2007). De acordo com os trabalhos de Biagi et al., (2007), a introdução de BS, não afectou o pH do estômago nem do intestino delgado mas o pH do ceco sofreu um aumento. Apesar

dos ácidos orgânicos indissociados poderem atravessar a membrana e serem absorvidos pelo intestino delgado, dificilmente chegarão ao intestino grosso, a não ser que sejam microencapsulados (Piva et al., 1997), portanto um efeito directo do BS no pH cecal, é bastante improvável. A concentração intestinal de ácido butírico, não foi incrementada pelo BS proveniente da dieta animal em nenhum dos seus segmentos. Neste momento não há explicação de como é que o BS pode provocar um aumento do pH cecal, da concentração cecal de amónia e do ácido isobutírico, uma vez que a *Clostridia* contabilizada no ceco, não sofreu alteração devido ao BS (Biagi et al., 2007). Ainda de acordo com o mesmo ensaio, o BS não teve efeito no pH dos conteúdos do estômago, jejuno e íleo; mas o pH do conteúdo cecal aumentou com o BS, em comparação com o regime controlo.

4.4. Efeito do butirato de sódio na ingestão de alimento e nas performances zootécnicas

O butirato de sódio demonstrou em vários ensaios ter um efeito benéfico nas performances animais. Piva et al., 2002 constataram um efeito benéfico do BS logo nos primeiros 14 dias de ensaio, através de um aumento do ganho médio diário, mas vendo depois o seu efeito dissipado. Nos primeiros 35 dias de ensaio, a ingestão diária de alimento aumentou com um correspondente agravamento da eficiência alimentar, provavelmente relacionada com a resposta efectiva da arquitectura intestinal ao BS, apenas durante a 1ª fase (0-14 dias). No período subsequente o BS poderá ter estimulado a ingestão de alimento, sem haver uma correspondência efectiva na utilização dos nutrientes (Piva et al., 2002). Este composto não provou de forma clara uma acção benéfica sobre as performances de crescimento, no entanto leitões alimentados com este composto, apresentaram um valor numérico maior para o peso corporal final e para a ingestão diária de alimento (Biagi et al., 2007). Gálfi e Bokori (1990) verificaram que o BS melhorou a eficiência alimentar dos porcos, bem como uma melhoria no ganho de peso corporal. Também foi verificada uma melhoria do índice de conversão dos animais (Manzanilla et al., 2006). No entanto vários outros estudos reportaram que o uso do BS não melhorou as performances zootécnicas dos leitões. Estes efeitos incoerentes do BS no crescimento dos suínos podem ser associados com diferenças nas composições das dietas e com diferentes estados de maturação do intestinal.

4.5. Efeito do butirato de sódio na digestibilidade, na actividade enzimática microbiana e na microflora intestinal

A microflora intestinal contribui para a protecção contra os microrganismos patogénios através da competição pelos locais de ligação ao intestino, da regulação da resposta imunitária, da competição pelos nutrientes, da produção de substâncias anti-microbianas (tais como bactericidas) e da criação de um ambiente fisiologicamente restritivo, através da acidificação do pH do meio pela produção de ácido láctico e de ácidos gordos de cadeia curta obtidos através de processos de fermentação da responsabilidade dos *Lactobacillus*.

4.5.1. Efeito do butirato de sódio na digestibilidade dos alimentos

Em relação à função pancreática, a privação de alimento ou um pós-desmame rápido, conduz à acumulação de enzimas nos tecidos (Marion et al., 2002; Marion et al., 2003), com redução da secreção de suco pancreático para a lâmina própria do intestino, tal verifica-se porque as células não receberam a informação para libertar as enzimas. Este fenómeno poder-se-à verificar quando a quantidade de alimento ingerido é baixa (Makkink et al., 1994). Esta ocorrência vai originar problemas ao nível da digestibilidade dos alimentos, uma vez que as enzimas pancreáticas chegam em menor quantidade ao intestino. No ensaio levado a cabo por Manzanilla et al. (2006), observou-se que animais alimentados com BS apresentam uma redução da digestibilidade do amido a nível ileal e fecal, bem como uma redução da digestibilidade da matéria orgânica, ao longo de todo o tracto gastrointestinal. Portanto o elevado conteúdo de amido nas amostras fecais dos animais alimentados com BS, associado com a baixa concentração de ácidos gordos voláteis no cólon cranial, e a baixa proporção numérica de ácidos gordos voláteis espalhados na parte caudal do cólon suporta os baixos valores de digestibilidade da matéria orgânica.

4.5.2. Efeito do butirato de sódio na produção de AGV

Os ácidos gordos voláteis são o produto final produzido em maior quantidade pelo metabolismo bacteriano no intestino grosso dos suínos (Bergman, 1990) e poderão ser utilizados como índice da quantidade e da composição dos substratos a serem fermentados na parte posterior intestinal. Rações enriquecidas com BS afectam a concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta ao nível do jejuno e do íleo, não se verificando o mesmo com a concentração do ácido isobutírico, que foi superior ao nível do ceco (Biagi et al., 2007). Como o ácido isobutírico resulta da desaminação da valina e da leucina e é um indicativo da extensão do catabolismo proteico, este fenómeno parece sugerir que a proteólise cecal sofreu um aumento devido ao BS. O perfil dos ácidos gordos voláteis no estômago de animais que ingeriram BS mostrou um aumento da percentagem de butirato e um decréscimo da percentagem de acetato. Estas diferenças desaparecem no jejuno cranial. A dieta suplementada com BS, tem tendência a promover o decréscimo da concentração de ácidos gordos voláteis no cólon cranial (Biagi et al., 2007). Os resultados da concentração de ácidos gordos voláteis ao longo do intestino grosso de animais alimentados com BS mostram valores estáveis, apenas com pequenas variações entre o cólon e o recto. Gálfi e Bokori (1990) observaram que o butirato apenas estava presente no estômago e não no intestino. Eles propõem duas explicações para este facto; a conversão do butirato em substâncias tais como o ácido acético (Bugaut, 1987) ou a absorção do butirato na parte esofágica do estômago (Bugaut, 1987). Pode-se portanto afirmar que este composto influencia a fermentação levada a cabo pela microflora, mas esta acção depende da concentração de BS.

4.5.3. Efeito do butirato de sódio na microflora intestinal

O efeito anti-microbiano que os ácidos orgânicos, entre os quais, o butirato de sódio, podem ter ao nível da microflora intestinal ainda não é conclusivo. As propriedades antimicrobianas dos ácidos orgânicos poderão ser resultado da capacidade dos aniões orgânicos para bloquearem as células bacterianas (Russell and Diez-Gonzalez, 1998). Num estudo *in vitro* (Biagi et al., 2007), o BS inibiu apenas parcialmente a fermentação bacteriana, apesar do facto de que o BS foi adicionado aos tubos de fermentação *in vitro* numa concentração relativamente elevada. *In vivo*, a contagem bacteriana no jejuno, no íleo e no ceco não foi afectado pelo BS em leitões abatidos com 10 semanas de idade. Perez de Rozas et al. (2004); Castillo et al. (2006) observaram que dietas com BS promoviam uma elevada diversidade na microflora do tracto gastrointestinal, em particular nas partes caudais do intestino. A diversidade microbiana é uma medida da quantidade dos diferentes microrganismos detectados; também funciona como um indicador da estabilidade do microbiota intestinal (Zoetendal et al., 2004). Uma elevada biodiversidade microbiana poderá produzir um efeito benéfico nas performances animais porque, previne a proliferação de grupos simples de bactérias (Jensen et al., 2003). No ensaio de Biagi et al. (2007), as bactérias lácticas contabilizadas no jejuno, não sofreram qualquer influência por parte do BS. As concentrações de *Enterobacteriaceae* e *Clostridia* no jejuno, estavam abaixo do limite de detecção e portando não puderam ser determinadas. A quantidade de bactérias lácticas, *Enterobacteriaceae* e *clostridia* no ceco, não foi significativamente influenciada.

4.6. Efeito do butirato de sódio na morfologia da mucosa intestinal

Após o desmame o intestino delgado e a sua mucosa perdem cerca de 25% do seu peso relativo durante os primeiros 2 dias, necessitando de 5-10 dias para a sua recuperação (Spreeuwenberg, 2001). A atrofia das vilosidades particularmente no duodeno e na parte adjacente do jejuno foi repetidamente referida durante a fase degenerativa do desmame (Pluske et al., 1997; Spreeuwenberg, 2002). Inicialmente a profundidade das criptas intestinais pode (McCracken et al., 1999; Spreeuwenberg, 2001) ou não sofrer uma redução. No caso de leitões precocemente desmamados; as alterações na morfologia das criptas e das vilosidades (criptas mais profundas e vilosidades mais curtas) induz uma diminuição das secreções intestinais, bem como uma redução da capacidade de absorção (Tang, et al., 1999). O desmame provoca uma redução na densidade celular das vilosidades, seguida de um aumento de densidade entre o 3º dia e o 5º dia de pós-desmame (Dunsford et al., 1991). Este padrão pode ter resultado de um período de anorexia no pós-desmame uma vez que a subnutrição provocou um baixo nível de mucina (Lopes-Pedrosa, et al., 1998) e uma quebra de densidade celular nas vilosidades (Nunez et al., 1996). O butirato fornecido no alimento poderá reduzir alguns dos efeitos negativos do desmame, providenciando à mucosa ileal e à mucosa da parte posterior do intestino, uma fonte preferencial de energia, visto o butirato ser considerado um nutriente importante para a integridade do epitélio ao longo do tracto gastrointestinal (Scheppach et al., 1996). Manzanilla et al. (2006) verificaram que animais alimentados com BS apresentavam um maior número de células de goblet no cólon. O período de pós-desmame, caracteriza-se por haver

um efeito negativo sobre a estrutura das vilosidades devido à transição para a alimentação sólida. Será esta a altura em que o intestino poderá beneficiar de um efeito benéfico do BS na modulação do crescimento (Hodin et al., 1997). Quanto ao modo como o BS afectou a altura das vilosidades e a profundidade das criptas, não se obtiveram resultados concordantes. Segundo Gálfi and Bokori (1990) este acidificante afectou o crescimento e a diferenciação das células epiteliais, aumentou o comprimento das microvilosidades ileais e a profundidade das criptas cecais na mucosa intestinal de leitões em crescimento. Pelo contrário Piva et al. (2002), em leitões desmamados alimentados com tributirina e lactitol, como precursores do ácido butírico, a profundidade das criptas cecais foi reduzida. No caso do ensaio de Biagi et al. (2007) o BS, não teve um efeito significativo na morfologia intestinal, tal poder-se-à dever ao facto da concentração de BS, ao longo o intestino não ter sofrido um aumento, sugerindo uma rápida metabolização do BS antes de chegar ao jejuno.

Os enterócitos apresentam uma função secretora quando estão na cripta, e uma função de absorção quando migram para a vilosidade, o que implica que a absorção líquida no intestino delgado depende da razão entre a altura das vilosidades e da profundidade das criptas (AV/PC) (Buddle and Bolton, 1992). O decréscimo nesta razão a seguir ao desmame prejudica a absorção e incrementa o risco de diarreias (Pluske et al., 1997). Na experiência de Manzanilla et al. (2006) nos animais que ingeriram BS, ocorreu um decréscimo da relação AV/PC, devido a um aumento da profundidade da cripta. Esta baixa relação, não esteve associada a alterações ao nível da digestibilidade da matéria orgânica ileal e encontra-se presente nos grupos com melhores performances produtivas. Como ficou demonstrado por Vente-Spreeuwenberg et al. (2003), a altura das vilosidades está directamente relacionada com a performance produtiva e com a consistência fecal, mas não com a profundidade das criptas. As alterações na razão AV/PC, verificadas por Manzanilla et al. (2006), foram apenas resultado do aumento da profundidade das criptas, não podendo este acto ser considerado um factor de risco para os leitões. No caso de animais alimentados com dietas suplementadas com BS, os linfócitos interepiteliais (LIE) não sofrerem qualquer alteração e as células de goblet aumentaram no íleo. Jiang et al. (2000) relataram uma maior activação do sistema imunitário. Os linfócitos também demonstraram ter uma função importante na regulação da renovação, crescimento e diferenciação do epitélio (Matsumoto et al., 1999), tendo o BS promovido uma melhor regulação da renovação epitelial (Manzannilla et al., 2006).

4.7. Efeito do butirato de sódio no controlo das diarreias no pós-desmame

O intestino delgado tem uma enorme superfície continuamente exposta a um cem números de antígenos, compostos tóxicos e bactérias, tornando-o bastante susceptível a inflamações. Esta continua interacção entre enterócitos, microflora e sistema imunitário é fundamental para a manutenção do correcto funcionamento celular e para a protecção das células contra agressões do meio exterior (Xavier, 2000; Uzzau, 2000). Os patógenos entéricos podem danificar severamente as células intestinais, interferindo por exemplo, nas células epiteliais de sinalização, que controlam o caminho das secreções tanto as transcelulares como as paracelulares (van Heugten et al., 2003). O desmame em leitões está associado a uma regulação precoce de citocinas pró-inflamatórias, que

provavelmente contribuem para desordens funcionais precoces no intestino, favorecendo as diarreias. Como forma de prevenir a ocorrência de desordens intestinais em larga escala, a **mucosa intestinal promove alguma imunidade**. Através de um complexo mecanismo é capaz de remover patógenos, eliminar células infectadas e desenvolver uma memória imunológica que induz uma rápida resposta contra o mesmo antígeno numa subsequente exposição. O sistema imunitário intestinal tem de ser capaz de prevenir reacções de hipersensibilidade contra proteínas alimentares, microflora normal e macromoléculas inócuas presentes no organismo.

O BS ao promover o aumento da altura das vilosidades intestinais vai prevenir a ocorrência de diarreias. Por outro lado ao condicionar o desenvolvimento de bactérias patogénicas, vai promover o aumento do número de bactérias benéficas, reduzindo assim a ocorrência de diarreias.

II. Material e métodos

O ensaio realizado teve como objectivo o estudo das consequências da utilização de butirato de sódio na alimentação de leitões no período de pós-desmame.

Este ensaio compreendeu duas etapas; uma etapa experimental que foi realizada num pavilhão anexo pertencente à Secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia (ISA) e uma etapa analítica realizada no Laboratório Pais de Azevedo também no ISA e na Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

1. Animais

Para este ensaio foram no total utilizados 36 leitões (machos). Estes animais eram F₁ provenientes de cruzamento entre as raças Duroc e Landrace. O ensaio decorreu com duas repetições, em que cada uma delas contou com 18 leitões e durou 5 semanas. Os leitões iniciaram o ensaio com 3 semanas de idade e com um peso vivo médio de cerca de 6,94 ($\pm 0,70$) kg. Os animais foram divididos por 3 lotes, contendo cada um 12 leitões distribuídos de forma homogénea em função do peso vivo. Cada lote de animais foi alimentado *ad libitum* com um dos 3 regimes experimentais, encontrando-se os seus constituintes (g/kg) e composição química (%) nas **tabelas 3 e 4** respectivamente.

Tabela 3. Composição (g/kg) dos regimes experimentais.

Composição (g/kg)	Regimes		
	RB	Butirato A	Butirato B
Trigo	661	656	658,5
Bagaço de soja (48)	160	160	160
Soro de leite	50	50	50
Farinha de peixe (70)	70	70	70
Óleo de soja	30	30	30
Butirato de sódio	0	5	2,5
L- Lisina	4	4	4
DL- Metionina	2	2	2
Carbonato de cálcio	7	7	7
Fosfato bicálcico	9	9	9
Cloreto de sódio	2	2	2
CMV ^{(1) (2)}	5	5	5

(1) Complexo mineral e vitamínico.

(2) Composição do complexo mineral e vitamínico por kg de alimento: vit. A: 25000; vit. D3: 2000; vit. E: 0,120; vit. C: 0,200; vit. K3: 1; vit. B1: 1,5; vit. B2: 5; vit. B3: 30; vit. B5: 15; vit. B6: 2,5; vit. B9: 0,500; vit. B12: 0,030; vit. H-12: 80; vit. Colina: 0,300.

Minerais (mg): Fe: 120; Cu: 160; Mn: 50; Zn: 140; I: 1; Co: 0,500; Se: 0,300.

Tabela 4. Composição química dos regimes experimentais.

Composição química (%)	Regimes		
	RB	Butirato A	Butirato B
Matéria seca	90,5	90,2	90,4
Cinza	5,41	5,52	5,30
Proteína bruta (N x 6,25)	19,52	19,64	19,67
NDF	10,66	11,50	11,98
ADF	2,79	3,01	3,14
Lisina ⁽¹⁾	1,32	1,32	1,32
Metionina ⁽¹⁾	0,70	0,70	0,70
Trionina ⁽¹⁾	0,82	0,82	0,82
Triptofano ⁽¹⁾	0,24	0,24	0,24

⁽¹⁾ Valores calculados de acordo com (NRC, 1998).

Os animais foram instalados individualmente em gaiolas de metabolismo, feitas em metal com um piso em ripado e equipadas com tabuleiros em aço inoxidável para a separação das fezes e das urinas. Estas gaiolas dispunham de um bebedouro de chupeta e de um comedouro. A sala permitia o controlo da temperatura ambiente através do recurso a equipamentos de ar condicionado.

2. Regimes experimentais

Os regimes alimentares dos leitões foram preparados na fábrica de rações adjacente à Secção de Produção Animal do ISA. A formulação base dos 3 regimes teve em conta as necessidades alimentares dos leitões respeitando as recomendações do NRC (1998) para leitões entre os 5 - 20kg de peso vivo. Foram fabricados 3 regimes experimentais distintos; um regime de base (RB) que serviu de controlo, um regime em que foi introduzido 0,5% de butirato de sódio A (regime A) (doseando 54% de ácido butírico) e um regime em que foi introduzido 0,25% de butirato de sódio B (regime B) (doseando 98% de ácido butírico). Assim os regimes A e B diferem na fórmula química do butirato utilizado mas fornecem quantidades equivalentes de ácido butírico.

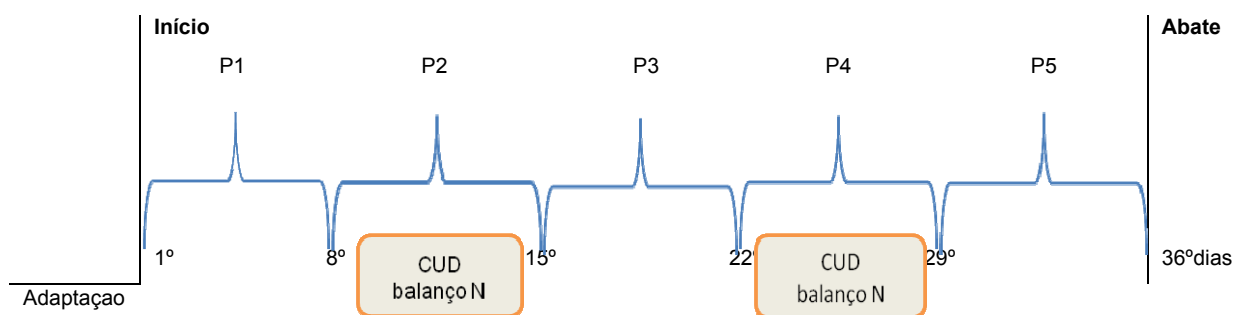
A preparação dos vários regimes começou com o processo de moenda do trigo num moinho de martelos móveis com crivo de 3mm de diâmetro. Seguiu-se a pesagem das diferentes matérias-primas e a introdução destas numa misturadora horizontal com fita em espiral onde todos os ingredientes foram misturados. Por último, os regimes sofreram um processo de granulação numa prensa com um crivo de 3mm e após um período de arrefecimento o alimento já granulado foi embalado.

3. Protocolo experimental

O período experimental começou após um período de adaptação dos leitões aos regimes que durou quatro dias. A recolha dos refugos alimentares, das fezes e das urinas foi sempre individual, diária e matinal, com posterior conservação numa arca frigorífica a -20°C , até ao dia do seu processamento. Os refugos diários e matinais foram agrupados em lotes semanais. As urinas foram recolhidas diariamente para um recipiente, onde haviam sido introduzido 5ml de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) a 5% como forma de impedir a rápida volatilização do azoto (**Ilustração 4**).

A distribuição do alimento foi feita em duas refeições diárias, sendo a quantidade distribuída ajustada de forma a assegurar pelo menos 10% de refugo.

Ilustração 4. Esquema do protocolo experimental.



Os animais foram controlados durante 5 semanas consecutivas com pesagem dos animais no início de cada semana. A consistência das fezes foi controlada diariamente numa escala de 0 – 3, de acordo com Marquardt et al. (1999), conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5. Índice de consistência fecal e respectivo estado das fezes.

Índice de Consistência	Estado das fezes
0	Normais
1	Moles
2	Diarreia moderada
3	Diarreia severa

No final do período experimental os leitões foram abatidos após um jejum de 12h. Ao abate foram recolhidos os conteúdos intestinais que mais tarde foram analisados para a determinação da matéria seca, dos ácidos gordos voláteis e da actividade enzimática. Também foram retiradas amostras de 3 segmentos do intestino delgado; duodeno (a cerca de 10 cm abaixo do piloro), jejuno (a cerca de 5,5 m abaixo do piloro) e íleo (a cerca de 60 cm da válvula ílio-cecal), que foram fixadas em formol tamponado, para observação e medida das características morfológicas das criptas e das

vilosidades intestinais. O desenvolvimento do tracto gastrointestinal foi controlado ao abate a partir do peso do estômago cheio e vazio, do peso do intestino delgado cheio e vazio e do seu comprimento, do peso do intestino grosso cheio e vazio e o seu comprimento, do peso do baço, do peso do pâncreas, do peso do fígado e do peso da vesícula biliar. Também foi determinado o pH dos conteúdos estomacais, do íleo, do ceco e do cólon.

3.1. Preparação das amostras dos regimes alimentares, das fezes e das urinas

Para serem submetidos a análise as amostras dos regimes alimentares foram moídos num moinho Retch com um crivo de 1mm de diâmetro. As fezes a analisar, foram previamente descongeladas, introduzidas num tabuleiro de alumínio e pesadas (peso das fezes húmidas). De seguida foram introduzidas numa estufa à temperatura de 70°C, onde sofreram uma secagem, com posterior arrefecimento e pesagem (peso das fezes secas). As fezes já secas foram moídas num moinho Retch com um crivo de 1mm de diâmetro e armazenadas em frascos individuais para posteriormente serem analisadas de forma a determinar a digestibilidade fecal aparente. As urinas de cada período de recolha sofreram uma descongelação, homogeneização e nova congelação em frasco, para posterior determinação do balanço azotado.

4. Análises

4.1. Determinação dos ácidos gordos voláteis (AGV)

Os AGV foram determinados ao nível dos conteúdos íleais, cecais e do cólon e foram doseados pelo método de Jouany (1982). Após o abate foram recolhidas amostras dos vários conteúdos para frascos onde haviam sido introduzidos 2ml de ácido ortofosfórico (0,03 M) e que foram posteriormente congelados a -20°C. Aquando da utilização das amostras, estas foram primeiro descongeladas em meio fresco e de seguida centrifugadas (Beckman J2-Hs) a 5000 r.p.m. durante 15min. A partir do sobrenadante obtido foram retiradas duas amostras de 1ml cada para dois eppendorf, sendo posteriormente congelados. Aquando da sua utilização as amostras contidas no eppendorf foram descongeladas e adicionou-se 1ml de ácido metil valérico a 1% (p/v) e homogeneizou-se antes da injeção da amostra (0,3 µl) no cromatografo. O injectore e o detector estavam a 120°C de temperatura, enquanto que o forno inicialmente encontrava-se a 120°C (nos 1^{os} 7min), mas por cada minuto que passava foi aumentada em 10°C até atingir os 170°C de temperatura. O gás de arraste foi o hidrogénio. A separação e identificação dos ácidos gordos voláteis (acético, propiónico e butírico) foi realizada num aparelho Perkin-Helmer, por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se como padrão interno o ácido metil valérico.

4.2. Determinação da actividade enzimática microbiana

Após o abate foram retiradas amostras do conteúdo do ceco e do cólon para frascos que já continham 10ml de uma solução tampão fosfato (pH 6) e foram conservadas a -80°C. Antes de serem utilizadas as amostras passaram por 2 ciclos de congelação e descongelação de forma a promover a ruptura das membranas celulares. Depois cada amostra foi submetida a um ciclo de sonicações de 4min, que consistia em 30s de sonicação seguido de 30s de repouso isto tudo em meio fresco. De seguida procedeu-se à centrifugação das amostras a 12000 r.p.m. durante 12 min. O sobrenadante resultante foi retirado em triplicado para tubos de eppendorf e imediatamente congelados a -20°C. A determinação da actividade das enzimas decorreu de acordo com o método de Jehl et al. (1996). Para a determinação foram utilizados tubos de ensaio que contendo 5ml do respectivo substrato (Pectina de citrinos Sigma P-9135, Xilana Sigma X-0502, Carboximetilcelulose Sigma C-5678) e 1,5 ml de solução tampão fosfato (pH 6), foram colocados em banho-maria a 39°C. Os tempos de incubação estudados foram: 0 minutos, 30 minutos e 60 minutos. Para esses tempos foram introduzidos 700 µl de conteúdo dos tubos de ensaio para os eppendorfs onde já se encontrava igual volume de DNSA (3,5 ácido-dinitrosalicílico), o que fez com que a reacção parasse.

Os eppendorfs foram introduzidos num banho-maria a 100°C durante 20 minutos. Após esse tempo foram retirados e deixados a arrefecer, para que adquirissem a cor final e assim se pudesse fazer a leitura no espectrofotómetro. A leitura foi feita a uma absorvância de 575 nm de comprimento de onda.

4.3. Morfologia da mucosa intestinal dos leitões

Esta análise consistiu na medição da profundidade das criptas e da altura e largura das vilosidades intestinais. Das amostras de duodeno, jejuno e íleo, foram preparados cortes histológicos de 7 µm, corados com hematoxilina-eozina e introduzidos em lâminas ao microscópio e observados com uma objectiva de 10x. As fotografias necessárias para reunir um número mínimo de 10 criptas e de 10 vilosidades por segmento e por animal foram tiradas com uma câmara digital (Olympus DP 11) copulada ao microscópio (Olympus BX511). As imagens foram descarregadas e as medições foram efectuadas (software Olympus DP Soft) num computador.

4.4. Determinações analíticas a partir dos regimes alimentares, das fezes e da urina

- a) *Matéria seca residual (MS)*: obtida através da secagem da amostra a 103°. Expresso em % da massa da amostra.

$$M.S. (\%) = \left(\frac{ma}{md} \right) \times 100$$

em que:

ma – gramas de amostra antes da secagem

md – gramas de amostra depois da secagem

- b) *Cinza*: obtida através da incineração da amostra numa mufla a 550°C.
- c) O NDF (fibra neutro-detergente), o ADF (fibra ácido-detergente) e o ADL (lenhina ácido-detergente) foram determinados utilizando o sistema Fibertec de acordo com o método de Van Soest et al. (1991).
- d) *Azoto*: utilizou-se o sistema de digestão 1015 Digester Tecator e a unidade de destilação 1026 Tecator, com posterior titulação manual. Para a fórmula entrou-se em linha de conta com o método de Kjeldahl para o cálculo do azoto total.

$$\text{Azoto (\%)} = \left(\frac{(v1 - v2) \times N \times 14,007 \times 10^{-3}}{m} \right) \times 100$$

em que :

v1 - volume de ácido clorídrico consumido na titulação da amostra.

v2 - volume de ácido clorídrico consumido na titulação do ensaio em branco.

N - normalidade da solução de ácido clorídrico utilizada.

m – gramas de amostra.

Para determinar a proteína bruta, multiplica-se o valor de azoto obtido por 6,25 visto partir-se do princípio que toda a proteína contém 16% de azoto. O teor de proteína foi calculado nas fezes, no regime alimentar e na urina.

4.5. Medição do pH dos conteúdos do tracto gastrointestinal

Esta determinação foi feita imediatamente após o abate de cada animal. As amostras retiradas do conteúdo estomacal, ileal, cecal e do cólon foram respectivamente homogeneizadas e medidas com recurso ao aparelho WTW pH 522.

5. Cálculos

5.1. Performances de crescimento

- a) *Ganho médio diário* (GMD): calculado pela razão entre o ganho de peso e o intervalo de dias que medeia duas pesagens.

$$\text{GMD} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{intervalo de tempo (dias)}}$$

- b) *Índice de conversão* (IC): quantidade de alimento ingerido pelo animal, para que este aumente um kg de peso vivo.

$$\text{IC} = \frac{\text{alimento ingerido (kg) em determinado tempo}}{\text{ganho de peso (kg) em determinado tempo}}$$

O alimento ingerido é calculado pela diferença entre a quantidade fornecida e a refugada.

5.2. Digestibilidade fecal aparente

A digestibilidade fecal aparente exprime a fracção do nutriente que é absorvida pelo animal. Este valor foi calculado para; matéria seca (MS), cinza, proteína bruta (PB) e fracções NDF e ADF.

$$\text{CUDap} = \left(\frac{\text{ing} - \text{exc. fezes}}{\text{ing}} \right)$$

5.3. Balanço azotado

- a) *Coeficiente de retenção azotada (CRN)*: representa o azoto retido em percentagem de azoto absorvido.

$$\text{CRN (\%)} = \left(\frac{(\text{N ing} - \text{N exc.fezes} - \text{N exc.urina})}{(\text{N ing} - \text{N exc.fezes})} \right) \times 100$$

- b) *Coeficiente de utilização prático do azoto (CUPN)*: exprime o azoto retido em percentagem de azoto ingerido.

$$\text{CUPN (\%)} = \left(\frac{\text{N ing}}{\text{N ing} - \text{N exc.fezes}} \right) \times 100$$

6. Tratamento estatístico dos dados

O número de unidades experimentais ficaram reduzidas a 32 devido à morte de 4 leitões ao longo do ensaio.

Os resultados foram comparados através do método dos contrastes polinomiais. Para se evidenciar o efeito do butirato de sódio contrastou-se o regime RB com os regimes A e B. O efeito do butirato A foi analisado pelo contraste entre os regimes RB e A. A utilização do butirato B foi estudada pelo contraste entre os regimes RB e B e a comparação entre as duas fontes de butirato de sódio foi feita pelo contraste entre os regimes A e B. O contraste dos resultados sobre as performances dos leitões, consistência fecal, digestibilidade e balanço azotado, foi realizado através do procedimento MIXED do programa SAS, o tratamento estatístico das restantes variáveis foi realizado através do procedimento GLM do programa SAS (SAS, 1991).

Para análise do efeito da idade dos leitões (período) sobre as performances de crescimento, a consistência fecal, a digestibilidade e o balanço azotado dos leitões, os dados foram também comparados por análise de variância utilizando o efeito do regime e do período como variáveis independentes. Esta análise de variância foi realizada pelo procedimento MIXED do programa SAS devido à existência de medidas repetidas no tempo (Littell et al., 1998).

III- Resultados

1. Performances de crescimento

Os resultados obtidos para este parâmetro encontram-se na **tabela 6**. A média do peso inicial dos leitões foi de 6,95 kg e a média do peso final foi de 28,3 kg ($P < 0,05$). Verificou-se que o butirato de sódio não afectou significativamente a ingestão de alimento, o ritmo de crescimento e o índice de conversão (IC) dos leitões. Contudo o ganho médio diário aumentou nas 4 primeiras semanas mas sofreu um decréscimo na última. O índice de conversão médio foi de 1,63, verificando-se uma redução durante as 3 primeiras semanas.

Os registos para a verificação da consistência fecal encontram-se na **tabela 6**. Quanto maior o valor do índice fecal, menor é a consistência das fezes. Pode-se verificar que a consistência das fezes sofreu uma melhoria com o decorrer do ensaio, o que traduz a adaptação digestiva dos leitões ao regime. Por outro lado verificou-se uma tendência ($P = 0,0807$) para que a consistência fecal seja melhorada pela inclusão de butirato B no regime de desmame dos leitões.

2. Digestibilidade fecal aparente

A digestibilidade fecal aparente da matéria seca (CUD MS) teve tendência para ser superior em ($P = 0,0631$) nos animais alimentados com o regime B em comparação com o RB (**tabela 7**). A ingestão de BS promoveu um aumento do CUD PB em especial no caso do butirato B com um aumento da digestibilidade da PB de cerca de 8% ($P = 0,0023$) quando comparado com o RB, e de 6% comparativamente ao butirato A. O CUD do NDF teve tendência para aumentar nos leitões que ingeriram o butirato de sódio B, em comparação com o RB. Este parâmetro apenas foi significativamente afectado pela idade dos leitões constatando-se uma redução de 15 % ($P = 0,0312$) do 1º para o 2º período experimental. A digestibilidade do ADF foi significativamente afectada pelo regime. Os animais que ingeriram BS, em especial o butirato B, sofreram um aumento de CUD ADF em comparação com o RB e mesmo com o butirato A.

Tabela 6 - Efeito do butirato de sódio nas performances de crescimento e na consistência fecal de leitões das 3 às 8 semanas de idade.

	Regime ⁽¹⁾			Período ⁽²⁾					Análise estatística ⁽³⁾					
	RB n=11	A n=10	B n=11	P1	P2	P3	P4	P5	Butirato	A	B	A vs B	Período	DRV
Peso inicial (kg)	6,93	7,01	6,90	-	-	-	-	-	0,9262	0,8065	0,9315	0,7465	-	0,70
Peso final (kg)	27,92	28,37	28,61	-	-	-	-	-	0,4799	0,6060	0,4844	0,8564	-	2,87
Ingestão g/dia	905	961	964	407	721	1060	1219	1309	0,2180	0,2968	0,2799	0,9700	<0,0001	370
Ganho médio diário (g)	593	610	620	268	556	787	788	641	0,4383	0,6048	0,4149	0,7685	<0,0001	22
Índice de conversão	1,70	1,62	1,57	1,73	1,40	1,37	1,57	2,08	0,1701	0,3423	0,1588	0,6439	<0,0001	0,58
Consistência fecal	0,7415	0,6886	0,4468	1,3199	1,0626	0,3654	0,2701	0,1104	0,2315	0,7534	0,0807	0,1580	<0,0001	1,12

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Período semanal.

(3) Butirato— regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A – regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B – regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B – regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR – desvio padrão residual.

Tabela 7. Efeito do butirato de sódio na digestibilidade fecal aparente do regime.

	Regime ⁽¹⁾			Período de recolhas ⁽²⁾		Análise estatística ⁽³⁾					
	RB n = 11	A n=10	B n= 11	Período 1	Período 2	Butirato	A	B	A vs B	Período	DPR
CUD MS	0,816	0,814	0,867	0,824	0,840	0,2853	0,9491	0,0631	0,0606	0,2573	0,085
CUD Cinza	0,528	0,571	0,624	0,587	0,562	0,1702	0,4655	0,1040	0,3830	0,4847	0,185
CUD PB	0,772	0,790	0,838	0,787	0,813	0,0202	0,3633	0,0023	0,0287	0,1750	0,089
CUD NDF	0,480	0,521	0,605	0,578	0,492	0,1290	0,5086	0,0510	0,1957	0,0312	0,199
CUD ADF	0,007	0,068	0,290	0,146	0,097	0,0353	0,5034	0,0042	0,0233	0,4821	0,398

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Período de recolha fecal em função da idade dos leitões.

(3) Contrastes: butirato - regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A – regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B – regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B – regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR – desvio padrão residual.

3. Desenvolvimento do tracto gastrointestinal dos leitões em função do regime ingerido

Comparando as duas fórmulas de butirato, verificou-se uma tendência ($P = 0,0714$) para menor peso relativo (g/kg PV) do estômago vazio nos leitões alimentado com butirato B (**tabela 8**). Da mesma forma o peso vazio dos intestinos foi reduzido com a inclusão do butirato no regime de desmame. Assim o peso do intestino delgado foi reduzido em cerca de 5% e de 13% com o butirato A e B respectivamente ($P = 0,0457$). Ao nível do intestino grosso este efeito assumiu maior dimensão, com uma redução de cerca de 14%, independentemente da composição do butirato utilizado ($P = 0,0025$). Comparativamente ao RB o peso relativo do pâncreas, fígado e vesícula não foi significativamente modificado pela natureza do butirato de sódio, mas o peso do baço foi aumentado em 17% no caso do butirato B ($P = 0,0329$). O comprimento do intestino grosso (m/kg), aumentou com o recurso ao butirato em especial com o butirato A.

Tabela 8. Efeito do butirato de sódio no peso (g/kg peso vivo) dos componentes do aparelho digestivo e do baço.

	Regime ⁽¹⁾			Análise estatística ⁽²⁾				
	RB n=11	A n=10	B n=11	Butirato	A	B	A vs B	DPR
Peso vivo (kg)	28,4	28,7	28,7	0,7519	0,7674	0,8042	0,9626	2,60
Estômago								
Cheio	11,1	11,6	11,7	0,5533	0,6262	0,5938	0,9636	2,42
Vazio	7,4	8,0	7,1	0,7664	0,2339	0,4882	0,0714	1,03
Intestino delgado								
Cheio	45,9	43,9	42,0	0,2251	0,4672	0,1737	0,5229	6,30
Vazio	36,7	34,7	31,8	0,0457	0,2970	0,0172	0,1581	4,36
Comprimento (m/kg)	0,57	0,57	0,57	0,9819	0,9124	0,9433	0,8593	0,056
Intestino grosso								
Cheio	37,7	34,5	33,2	0,1590	0,3094	0,1571	0,6836	6,95
Vazio	20,1	17,4	17,5	0,0028	0,0071	0,0106	0,8676	2,08
Comprimento (m/kg)	0,12	0,11	0,11	0,0799	0,0903	0,1809	0,7090	0,014
Pâncreas	2,14	2,19	2,15	0,8515	0,7468	0,9991	0,7512	0,27
Fígado	26,0	24,7	24,6	0,2226	0,3095	0,2762	0,9413	2,88
Vesícula	1,11	1,31	0,96	0,8759	0,2405	0,3608	0,0471	0,37
Baço	2,00	2,14	2,35	0,0754	0,3608	0,0329	0,2055	0,36

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Contrastes: butirato - regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A – regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B – regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B – regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR – desvio padrão residual.

4. Conteúdos do tracto gastrointestinal: determinação da matéria seca (MS) e do pH

Os dados relativos ao teor de MS e ao pH dos conteúdos intestinais são apresentados na **tabela 9**. O teor de MS dos conteúdos intestinais aumentou do íleo para o cólon traduzindo a absorção de água que ocorre no intestino grosso. Por outro lado a composição do regime apenas afectou significativamente o teor de MS dos conteúdos ileais, o qual diminui de 1,4 pontos percentuais com a inclusão de butirato de sódio ($P = 0,0186$).

Pelo contrário o pH dos conteúdos dos diferentes compartimentos do tubo digestivo não foi significativamente afectado pela composição dos regimes experimentais. Assim o pH foi em média de 2,26; 6,77; 6,13 e 6,77 no estômago, íleo, ceco e cólon, respectivamente.

Tabela 9. Efeito do butirato de sódio na matéria seca e no pH dos conteúdos do tracto gastrointestinal.

	Regime ⁽¹⁾			Análise estatística ⁽²⁾				
	RB n=11	A n=10	B n=11	Butirato	A	B	A vs B	DPR
Matéria seca (%)								
Íleo	6,67	5,33	5,10	0,0186	0,0594	0,0256	0,7336	1,55
Ceco	11,15	9,69	11,60	0,6282	0,2351	0,7015	0,1229	2,74
Cólon	22,40	20,27	22,88	0,5492	0,1908	0,7558	0,1109	3,62
pH								
Estômago	2,51	2,20	2,06	0,2658	0,4410	0,2469	0,7098	0,89
Íleo	6,75	6,78	6,77	0,6358	0,6541	0,7123	0,9301	0,18
Ceco	6,09	6,13	6,18	0,6835	0,8334	0,6238	0,7832	0,41
Cólon	6,76	6,73	6,86	0,7854	0,8017	0,4662	0,3375	0,32

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Contrastes: butirato - regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A - regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B - regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B - regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR - desvio padrão residual.

5. Morfologia da mucosa intestinal

Os resultados referentes à morfologia da mucosa intestinal englobam a altura e a largura das vilosidades e a profundidade das criptas, encontrando-se estes resultados na **tabela 10**. A largura das vilosidades no jejuno apresentou um aumento nos animais alimentados com o regime B em comparação com o RB ou butirato A ($P = 0,0353$). Quanto à altura das vilosidades ileais esta foi tendencialmente superior nos animais que ingeriram butirato de sódio A do que butirato de sódio B. No que se refere aos restantes parâmetros observados não ocorreram diferenças significativas em relação aos diferentes regimes. A altura média das vilosidades foi superior no duodeno com um valor de 309 μm . Também foi este segmento intestinal que apresentou uma maior largura média de vilosidades (197 μm) e uma maior profundidade média da cripta (485 μm). A razão AV/PC média

apresentou um valor superior ao nível do íleo (0.954 μm) e um valor inferior ao nível do duodeno (0.66 μm).

Tabela 10. Efeito do butirato de sódio na morfologia da mucosa intestinal.

	Regime ⁽¹⁾			Análise estatística ⁽²⁾				
	RB n=11	A n=10	B n=11	Butirato	A	B	A vs B	DPR
Altura das vilosidades (μm)								
Duodeno	309	323	295	1,000	0,5149	0,5056	0,1982	49
Jejuno	298	296	325	0,6418	0,9600	0,3957	0,3922	72
Íleo	295	312	280	0,9314	0,3437	0,4116	0,0867	41
Largura das vilosidades (μm)								
Duodeno	198	212	181	0,9229	0,5001	0,3924	0,1370	47
Jejuno	164	160	182	0,3896	0,6867	0,0656	0,0353	21
Íleo	169	163	167	0,5753	0,4928	0,7825	0,6758	22
Profundidade das criptas (μm)								
Duodeno	478	509	468	0,7946	0,5058	0,8192	0,3761	103
Jejuno	346	362	356	0,4805	0,4594	0,6432	0,7790	46
Íleo	337	302	330	0,5267	0,3664	0,8586	0,4640	87
AV/PC ⁽³⁾								
Duodeno	0,661	0,651	0,668	0,9743	0,8892	0,9314	0,8232	0,171
Jejuno	0,872	0,818	0,917	0,9552	0,5798	0,6389	0,3289	0,213
Íleo	0,945	1,039	0,877	0,8875	0,3910	0,5261	0,1455	0,246

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Contrastes: butirato - regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A – regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B – regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B – regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR – desvio padrão residual.

(3) AV/PC: altura da vilosidade / profundidade da cripta.

6. Actividade enzimática microbiana

A utilização de butirato de sódio no regime de desmame dos leitões reduziu a actividade enzimática microbiana nos conteúdos do ceco (**tabela 11**). Assim a actividade da xilanase foi reduzida em cerca de 22% ($P = 0,0101$), da pectinase em cerca de 28% ($P = 0,0002$) e da celulase em cerca de 18% ($P = 0,2481$). Relativamente à composição do butirato utilizado não houve diferenças significativas entre os regimes de butirato A e butirato B na actividade da xilanase, pectinase e celulase nos conteúdos do ceco.

Ao nível do cólon a utilização de butirato de sódio no regime não teve efeito sobre as enzimas microbianas em comparação com o RB. Finalmente a actividade da celulase no cólon aumentou em cerca de 30% no regime com butirato B comparativamente ao butirato A.

Tabela 11. Efeito do butirato de sódio na actividade enzimática microbiana (mg/ml).

	Regimes ⁽¹⁾			Análise estatística ⁽²⁾				
	RB n=11	A n=10	B n=11	Butirato	A	B	A vs B	DPR
Ceco								
Xilanase	274,1	208,1	218,0	0,0101	0,0167	0,0351	0,7041	59,1
Pectinase	344,1	261,8	237,0	0,0002	0,0034	0,0002	0,3386	58,3
Celulase	126,5	101,7	106,8	0,2481	0,2683	0,3761	0,8231	50,0
Cólon								
Xilanase	399,8	379,4	357,4	0,4631	0,6837	0,3878	0,6586	112,8
Pectinase	338,5	324,4	319,2	0,5284	0,6493	0,5247	0,8658	69,8
Celulase	145,6	133,6	173,21	0,5980	0,4880	0,1108	0,0286	38,9

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Contrastes: butirato - regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A – regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B – regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B – regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR – desvio padrão residual.

7. Determinação dos ácidos gordos voláteis (AGV) nos conteúdos intestinais

Os AGV produzidos pela fermentação intestinal e analisados foram; o ácido acético (**C2**), o ácido propiónico (**C3**) e o ácido butírico (**C4**).

Na **tabela 12** encontram-se os dados referentes ao efeito do butirato de sódio nos AGV dos conteúdos ileais. O ácido mais produzido no íleo foi o acético com um valor médio de 45,57 mmol/l. A adição de butirato de sódio aos regimes não produziu diferenças significativas em relação ao RB ($P > 0,005$). Quanto à proporção molar, em comparação com o RB o butirato B promoveu um aumento da relação ácido acético /ácido propiónico.

Os valores referentes à determinação de AGV no ceco são apresentados na **tabela 13**. O RB foi aquele que apresentou uma maior quantidade de AGVs produzidos na totalidade. Em comparação com o RB a adição de butirato de sódio A ou B promoveu uma redução na quantidade total de AGVs. O mesmo se verificou para o ácido acético e propiónico. O butirato de sódio B em comparação com o butirato A obteve valores de ácido butírico superiores. Quanto à proporção molar o butirato de sódio promoveu uma redução da relação ácido propiónico/ácido butírico.

Tabela 12. Efeito do butirato de sódio nos AGV dos conteúdos ileais.

	Regimes ⁽¹⁾			Análise estatística ⁽²⁾				
	RB n=11	A n=10	B n=11	Butirato	A	B	A vs B	DPR
AGV (mmol/l)								
C2 ⁽³⁾	44,7	43,1	48,9	0,9044	0,8905	0,7262	0,6316	27,08
C3 ⁽³⁾	7,0	6,3	6,1	0,5361	0,6333	0,5532	0,9173	3,56
C4 ⁽³⁾	3,9	5,2	3,6	0,6568	0,3553	0,8601	0,2749	3,19
Total	55,7	54,6	58,6	0,9386	0,9385	0,8312	0,7753	31,95
Proporção molar								
C2:C3	6,39	6,97	8,21	0,1057	0,4949	0,0356	0,1519	1,93
C2:C4	11,48	11,09	13,18	0,6553	0,8195	0,3153	0,2290	3,87
C3:C4	1,80	1,55	1,79	0,5034	0,2777	0,9601	0,2992	0,52
(C2:C3+C4)	4,08	4,16	4,85	0,3243	0,8745	0,1239	0,1746	1,14

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Contrastes: butirato - regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A - regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B - regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B - regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR - desvio padrão residual.

(3) C2 - ácido acético; C3 - ácido propiónico; C4- ácido butírico.

Tabela 13. Efeito do butirato de sódio nos AGV dos conteúdos cecais.

	Regimes ⁽¹⁾			Análise estatística ⁽²⁾				
	RB n=11	A n=10	B n=11	Butirato	A	B	A vs B	DPR
AGV (mmol/l)								
C2 ⁽³⁾	155,1	109,6	129,5	0,0020	0,0009	0,0403	0,1122	27,7
C3 ⁽³⁾	80,0	53,4	61,9	0,0142	0,0129	0,0745	0,4020	22,8
C4 ⁽³⁾	31,4	24,1	34,4	0,5685	0,1080	0,4939	0,0270	10,0
Total	266,5	187,0	225,8	0,0049	0,0018	0,0802	0,1024	52,3
Proporção molar								
C2:C3	2,38	2,48	2,54	0,3602	0,5371	0,3333	0,7376	0,38
C2:C4	5,47	5,05	4,65	0,1304	0,3713	0,0842	0,4050	1,08
C3:C4	2,48	2,10	1,84	0,0495	0,1995	0,0331	0,3848	0,67
(C2:C3+C4)	1,62	1,65	1,64	0,7286	0,7047	0,8273	0,8682	0,21

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Contrastes: butirato - regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A - regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B - regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B - regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR - desvio padrão residual.

(3) C2 - ácido acético; C3 - ácido propiónico; C4- ácido butírico.

A concentração (mmol/l) de ácido acético, propiónico e butírico nos conteúdos do cólon foi significativamente reduzida com a inclusão de butirato de sódio nos regimes dos leitões (**tabela 14**). Os teores de ácido acético, propiónico e butírico foram significativamente reduzidos de 35%, 48% e 32% ($P < 0,01$). Contudo, à excepção da relação C3:C4, a proporção molar dos AGV não foi significativamente diferente entre o RB e os regimes com butirato A ou B.

Tabela 14. Efeito do butirato de sódio nos AGV dos conteúdos do cólon.

	Regimes ⁽¹⁾			Análise estatística ⁽²⁾				
	RB n=11	A n=10	B n=11	Butirato	A	B	A vs B	DPR
AGV (mmol/l)								
C2 ⁽³⁾	63,6	46,8	35,0	0,0004	0,0154	0,0001	0,0804	14,8
C3 ⁽³⁾	27,7	18,2	10,8	0,0007	0,0249	0,0002	0,0760	9,2
C4 ⁽³⁾	13,6	10,8	7,6	0,0073	0,1216	0,0019	0,0881	4,0
Total	104,9	75,7	53,4	0,0002	0,0131	<0,0001	0,0518	25,1
Proporção molar								
C2:C3	3,36	3,06	3,30	0,5661	0,4170	0,8656	0,5166	0,84
C2:C4	5,66	5,18	4,81	0,2230	0,4481	0,1760	0,5601	1,44
C3:C4	1,85	1,72	1,47	0,0949	0,4429	0,0348	0,1734	0,41
(C2:C3+C4)	2,09	1,91	1,95	0,4022	0,4203	0,5221	0,8553	0,50

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Contrastes: butirato - regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A - regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B - regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B - regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR - desvio padrão residual.

(3) C2 - ácido acético; C3 - ácido propiónico; C4- ácido butírico.

8. Balanço azotado

Os dados referentes ao balanço azotado encontram-se na **tabela 15**. Nenhum dos parâmetros do balanço azotado variou significativamente com a composição dos regimes experimentais. Assim os leitões para uma ingestão média de azoto de 23,7 g/dia retiveram 15,4 g N/dia. Atendendo à eficiência de utilização do azoto do regime, o coeficiente de retenção azotada (CRN) foi em média de 78,7% e o coeficiente de utilização prática de azoto (CUPN) foi de 62,4% (tabela 8).

Os parâmetros do balanço azotado foram significativamente melhorados no segundo período experimental. Assim para um aumento de 80% na ingestão de azoto, a retenção diária de azoto foi duplicada no segundo período experimental. No primeiro e segundo período experimental o CRN foi respectivamente de 75,2% e 82% ($P = 0,0502$) e o CUPN foi de 57,8% e 62,0% ($P = 0,0097$).

Tabela 15. Efeito do butirato de sódio no balanço azotado dos leitões.

	Regime ⁽¹⁾			Período de recolha ⁽²⁾		Análise estatística ⁽³⁾					
	RB n=11	A n=10	B n=11	P 1	P 2	Butirato	A	B	A vs B	Período	DRV
N ingerido											
g/dia	22,4	24,1	24,6	16,9	30,5	0,1291	0,2493	0,1412	0,7422	<0,0001	8,00
g/dia/kg	1,47	1,52	1,53	1,55	1,46	0,1684	0,3048	0,1764	0,7393	0,1044	0,19
g/dia/kg. ^{0.75}	2,87	3,00	3,03	2,81	3,13	0,0888	0,1924	0,1006	0,7237	0,0052	0,42
N retido											
g/dia	14,3	15,5	16,4	10,2	20,5	0,2487	0,4572	0,2138	0,6149	<0,0001	7,09
g/dia/kg	0,89	0,94	1,01	0,91	0,98	0,2120	0,5110	0,1372	0,4031	0,3411	0,31
g/dia/kg. ^{0.75}	1,75	1,88	2,01	1,66	2,10	0,2112	0,4799	0,1490	0,4569	0,0042	0,64
CRN (%)	77,6	79,4	79,2	75,2	82,2	0,7624	0,7784	0,8115	0,9665	0,0502	16,8
CUPN (%)	59,8	61,2	66,2	57,8	67,0	0,4382	0,8064	0,2789	0,4082	0,0097	17,3

(1) RB - regime base; A - regime suplementado com butirato A; B - regime com butirato de sódio B.

(2) Período de recolha fecal em função da idade dos leitões.

(3) Contrastes: butirato - regime 1 vs 2+3 (efeito do butirato de sódio); A – regime 1 vs 2 (efeito do butirato de sódio A); B – regime 1 vs 3 (efeito do butirato de sódio B); A vs B – regime 2 vs 3 (comparação do efeito entre os 2 tipos de butirato); DPR – desvio padrão residual.

IV- Discussão

1. Efeito do butirato de sódio no crescimento dos leitões e no desenvolvimento do tubo digestivo

A análise das performances do crescimento dos leitões deve ser feita com prudência uma vez que os animais estavam instalados em gaiolas individuais. Apesar desta limitação os resultados mostram que a utilização de duas diferentes fontes de butirato no regime de desmame não melhorou o ritmo de crescimento nem o índice de conversão. Resultados concordantes foram referidos por Biagi et al. (2007) que concluíram que o butirato de sódio (BS), não melhorou significativamente as performances de crescimento, no entanto leitões alimentados com este aditivo, apresentaram numericamente um maior peso vivo final e uma maior ingestão diária de alimento do que os da dieta de controlo. Piva et al. (2002a), observaram que animais alimentados com BS, obtiveram uma melhoria do ganho médio diário e da ingestão diária de alimento nas primeiras semanas de ensaio, mas depois não foram observados quaisquer benefícios. Num estudo anterior, realizado por Ga'ifi and Bokori (1990), foi observado que o uso de butirato de sódio na dieta melhorou o ganho médio diário, a ingestão diária de alimento e o índice de conversão dos suínos. Os efeitos incoerentes da acção do butirato de sódio nos suínos, podem ser associados a diferenças na composição das dietas e no estado de maturação do intestino condicionado pela idade dos animais no início dos ensaios (Biagi et al., 2007).

Em relação à variação das performances dos leitões ao longo do ensaio, traduzido pelo efeito do período experimental, constatou-se um agravamento do índice de conversão nas últimas semanas do ensaio. Este resultado pode justificar-se por um aumento da deposição de gordura corporal com a idade dos leitões o que reduz a eficiência com a qual o alimento é utilizado para assegurar o seu crescimento.

Neste estudo constatou-se que a adição de butirato de sódio ao regime promoveu um decréscimo do peso dos intestinos, sendo este facto mais evidente com o butirato B. O comprimento do intestino grosso também foi reduzido com a adição de ambas as fontes de butirato nas dietas dos leitões. A redução do peso e comprimento dos intestinos poderá hipoteticamente reduzir a despesa de conservação dos leitões, contudo Kutunia et al. (2004) não verificaram qualquer diferença no comprimento do intestino delgado com a presença de butirato no regime alimentar.

Finalmente o aumento de peso do baço nos leitões alimentados com BS pode configurar um estímulo do sistema imunitário dado o contributo deste órgão para a imunidade activa do organismo.

2. Efeito do butirato de sódio na digestibilidade do regime

A digestibilidade fecal aparente representa a parte dos nutrientes ingeridos que não são excretados pelas fezes, isto é que foram absorvidos pelo organismo. Neste estudo a digestibilidade aparente da matéria seca não foi significativamente afectada pelo regime. Contudo verificou-se uma tendência para melhoria do CUD MS com o butirato B, que se pode justificar pelo aumento da digestibilidade das fracções PB e NDF. O aumento da digestibilidade aparente do PB pela inclusão de

butirato no regime e em especial do butirato B traduz um aumento da hidrólise e absorção intestinal da proteína do regime e/ou redução da excreção fecal endógena de azoto. O butirato de sódio, em especial o butirato B promoveu um aumento da digestibilidade do ADF, este resultado é difícil de explicar, uma vez que os resultados não mostram um aumento das enzimas microbianas no ceco e no cólon nem um aumento na quantidade de AGV produzidos.

A melhoria da consistência fecal com o butirato B está de acordo com o efeito positivo deste aditivo sobre a digestibilidade da MS e da PB do regime. Por outro lado a menor actividade fermentativa no intestino grosso dos leitões proporcionada pelo butirato B confirma o efeito positivo sobre a ocorrência de diarreias, uma vez que Plusk et al. (1995) demonstraram que a ocorrência de diarreias está positivamente correlacionada com o aumento da actividade fermentativa no intestino grosso dos leitões.

3. Efeito do butirato de sódio na actividade fermentativa

O pH dos conteúdos dos diferentes compartimentos não foi significativamente afectado pelo regime alimentar, o que confirma os resultados de Biagi et al. (2007). É aceite que o butirato de sódio (ácido fraco) ingerido em pequenas doses, juntamente com um baixo pH gástrico, é parcialmente absorvido no estômago (Ichikawa et al., 2002) tendo portanto um efeito limitado ou residual na redução do pH (Mazzoni et al., 2008; Manzanilla et al., 2006) nos conteúdos dos compartimentos do tracto gastrointestinal. A redução do teor de matéria seca nos conteúdos ileais com a adição de butirato de sódio, em especial com o butirato B, está de acordo com o aumento da digestibilidade proporcionada por este aditivo. Com efeito é provável que uma melhoria da digestibilidade das fracções MS e PB proporcione uma mais rápida hidrólise e absorção destas fracções com redução do teor de matéria seca dos conteúdos ileais.

As macromoléculas que não foram digeridas nos troços proximais do tracto digestivo, chegam ao intestino grosso onde servem de substrato à flora microbiana. A actividade microbiana intestinal traduzir-se-à pela produção de hidrolases bacterianas como por exemplo a xilanase, celulase e pectinase de cuja acção se libertarão açúcares simples que posteriormente são fermentados em AGV (Canudas, 2008).

A maior digestibilidade das fracções MS e PB e o menor teor de MS dos conteúdos ileais provocados pelo butirato, em especial pelo butirato B, permitem pressupor a chegada de menor quantidade de substrato ao intestino grosso dos leitões. Desta forma a redução da actividade das enzimas microbianas no ceco e na produção de AGV no ceco e no cólon dos leitões alimentados com butirato traduz uma menor actividade fermentativa intestinal como resultado da chegada de menor quantidade de substrato aos compartimentos distais do tubo digestivo dos leitões.

Manzanilla et al. (2008) verificaram que determinado regime suplementado com BS, tem tendência a promover o decréscimo da concentração de ácidos gordos voláteis no cólon resultado concordante com o obtido neste estudo em que tanto ao nível do cólon como do ceco a adição de BS promoveu uma redução da produção da totalidade de AGV.

Os ácidos gordos voláteis são o produto final produzido em maior quantidade pelo metabolismo bacteriano no intestino grosso dos suínos (Bergmen, 1990; Biagi et al., 2007). Assim a proporção molar entre os AGV produzidos poderá ser utilizada como índice da quantidade e composição dos substratos a serem fermentados nos compartimentos distais do intestino.

No presente ensaio o BS, principalmente o butirato B, induziu um aumento da relação C2:C3 no íleo o que indicia um ligeiro estímulo das enzimas e/ou da actividade microbiana produtora de ácido acético. Por outro lado no ceco o butirato de sódio B reduziu as relações C2:C4 ($P=0,0842$) e C3:C4 ($P=0,0331$) e no cólon reduziu a relação C3:C4 ($P=0,0348$), o que traduz que a redução na produção total de AGV foi feita principalmente à custa da menor produção de ácido acético e de ácido propiónico.

4. Efeito do butirato de sódio na morfologia intestinal

Nos dias que se seguem ao desmame, é normal que, o intestino delgado dos leitões sofra uma redução da altura das vilosidades e um aumento da profundidade das criptas, que está associada a um decréscimo da capacidade de absorção intestinal. Este cenário conduz; ao aumento da fermentação intestinal, ao aparecimento de diarreias no pós-desmame e a uma redução do alimento ingerido, que por sua vez, mais tarde, conduzirá a uma redução do fornecimento de nutrientes (Pluske et al., 1995). O butirato alimentar poderá reduzir alguns destes efeitos negativos associados ao desmame, providenciando à mucosa ileal e à mucosa da parte posterior do intestino, uma fonte de energia preferencial, com consequente estímulo da proliferação das células epiteliais e aumento da superfície de absorção.

Neste estudo, confirmando os resultados do ensaio levado a cabo por Biagi et al. (2007), a introdução de BS no regime alimentar dos animais não teve um efeito significativo na morfologia da mucosa intestinal. No entanto Gálfi e Bokori (1990) reportaram que animais alimentados com BS apresentavam um aumento do comprimento das vilosidades ileais e da profundidade das criptas intestinais. Wang et al. (2005) constatarem um aumento da altura das vilosidades intestinais bem como uma redução da profundidade das criptas cecais, em leitões alimentados com regimes suplementados com BS. No estudo de Biagi et al. (2007) foi proposto que uma das razões para o fraco efeito do BS na morfologia intestinal poderá dever-se ao facto da concentração de BS não ter aumentado ao longo do intestino o que poderá sugerir uma rápida metabolização antes mesmo de chegar ao jejuno. Por outro lado Hodin et al. (1997) verificaram que a eficácia do BS é maior no período imediatamente após o desmame em virtude das estruturas vilosas se encontrarem atrofiadas. No presente ensaio as amostras da mucosa intestinal foram recolhidas cerca de 6 semanas após o desmame, período este que possibilita alguma recuperação da atrofia que ocorre no pós-desmame (Gabert e Sauer, 1994). Este facto pode ter contribuído para a atenuar o efeito potencial do butirato de sódio sobre a morfologia intestinal.

V- Conclusão

Conclusões

A inclusão de butirato de sódio no regime alimentar dos leitões promoveu uma redução do peso dos intestinos, sem contudo afectar as vilosidades intestinais. Este efeito foi mais notório no regime suplementado com butirato de sódio B.

A digestibilidade fecal aparente da proteína bruta registou um aumento significativo com a introdução do butirato de sódio, especialmente no caso do regime B. Este facto contribuiu para uma tendência de aumento no que se refere à matéria seca. Em suma a utilização do butirato de sódio no regime de desmame promoveu uma melhoria na utilização digestiva dos alimentos.

O butirato de sódio ao aumentar a digestibilidade das dietas promoveu uma redução dos substratos que chegam ao intestino grosso. Desta forma vai ocorrer uma diminuição da actividade fermentativa nos compartimentos distais do tubo digestivo, com redução da actividade das enzimas microbianas e da produção de AGV.

- **Adams C.**, 1999. Book Nutricines: Food Components in Health and Nutrition. Nottingham University Press.
- **Argenzio, R. A.**, 1993. Secretory function of the gastrointestinal tract. In: M.J. Swenson and W. O. Reece (ed.) Dukes' Physiology of Domestic Animals (11th ed.) pp. 349-361. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- **Asano, T., Yuasa, Kunugita, K., Teraji, T., Mitsuoka, T.**, 1994. Effects of glucocic acid on human faecal bacteria. Microb. Ecol. Health Dis. 7:247-256.
- **Bach Knudsen, K. E.**, 2001. The nutritional significance of "dietary fibre" analysis. Animal Feed Sci. And Tecnol. 90:3-20.
- **Bach Knudsen, K. E., Jorgensen, H.**, 2001. Intestinal degradation of dietary carbohydrates- from birth maturity. In: Lindberg, J. E., Ogle, B. (eds.), Proceedings of the 8th Symposium of Digestive Physilogy of Pigs. CABI Publishing, Wallingford 109:129:
- **Bach Knudsen, K. E., Serena A., Canibe, N., Juntunen, K. S.**, 2003. New insight into butyrate metabolism. Proc. Nutr. Soc. 62:81-86.
- **Banks, W.**, 1993. Applied veterinary histology, 3rd ed. Harbound: Mosby.
- **Barnett, K. L., Kornegay, E. T., Risley, C. R., Lindmann, M. D., Schurig, G.G.**, 1989. Characterization of creep feed consumption and its subsequent effects on immune response, scouring index and performance of weanling pigs. J. Anim. Sci. 67:2698-2708.
- **Bergman, E. N.** 1990. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. Physiol. Rev. 70:567-590.
- **Biagi, G., Piva, A., Moschini, M., Vezzali, E., Roth, F. X.**, 2006. Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology. J. Anim. Sci. 84:370-378.
- **Biagi, G., Piva, A., Moschini, M., Vezzali, E., Roth, F. X.**, 2007. Performance intestinal microflora and wall morphology of weanling pigs fed sodium butyrate. J. Anim. Sci. 85:1184-1191.
- **Björck, I.**, 1996. Starch: analytical aspects: In. Carbohydrates in food, Eliasson, Ac Dekker, M. Ed. New York, USA, 505-554.
- **Bolduan, G., Jung, H., Schneider, R.**, 1988, Rye and wheat in piglet rations supplemented by bisergon. Arch. Tierernahr 38:183-191.
- **Bolton, W., Dewar, W. A.**, 1965. The digestibility of acetic, propionic and butyric acids by the fowl. Br. Poult. Sci. 6:103-105.
- **Bond, J. H., Levit M. D.**, 1976. Fate of soluble carbohydrate in the colon of rats and man. J. Clin Invest. 57:1158-1164.
- **Bosi, P., Casini, L., Finamore, A., Cremokolini, C., Merialdi, G., Trevisi, P., Nobili, F., Mengheri, E.**, 2004. Spray-dried plasma improves growth performance and reduce inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. J. Anim. Sci. 82:1764-1772.
- **Buddle, J. R., and J. R. Bolton.** 1992. The pathophysiology of diarrhoea in pigs. Pig News Inf. 13:41N-45N.

- **Bugaut, M.** 1987. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 86:439-472.
- **Canh, T. T., Verstegen, M. W. A., Aarnink, A. J. A., Shrama, J. W.,** 1997. The influence of dietary factors on nitrogen partitioning and composition of urine and feces of fattening pigs. *J. Anim. Sci.* 75:700-706.
- **Canibe, N., Hojberg, O., Hojsgaard, S., Jensen, B. B.,** 2005. Feed physical form and formic addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 83:1287-1302.
- **Canibe, N., Jensen, B. B.,** 2009. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *J. Anim. Sci.* 81:2019-2031.
- **Canibe, N., Steien, S. H., Overland, M., Jensen, B. B.,** 2001. Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acid in the digestive tract of piglets, and on stomach alterations. *J. Anim. Sci.* 79:2123-2133.
- **Canudas, M.,** 2008. Estudio del ecosistema bacteriano del tracto digestivo del cerdo mediante técnicas moleculares. CreSA, Universitat Autònoma de Barcelona.
- **Castillo, M., Martín-Orúe S. M., Roca M., Manzanilla E. G., Badiola I., Pérez J. F. and Gasa J.,** 2006. The response of gastrointestinal microbiota to the use of avilamycin, butyrate, and plant extract in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 84:2725-2734.
- **Chen Z. W., Bergman, T., Ostensen, C. G., Efendic S., Mutt, V., Jornvall, H.,** 1997. Characterization of dopuin, a polypeptide with special residue distribution. *Eur. J. Biochem.* 249:518-522.
- **Chesson, A.,** 1993. Feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45:65-79.
- **Cranwell, P. D., Moughen, P. J.,** 1989. Biological limitations imposed by the digestive system to the growth performance of weaned pigs. 140-159 in *Manipulating pig production II*. J. L. Barnett and D. P. Hannessy, ed. Australian Pig Science Association, Werribee, Australia.
- **Cummings, J. H.,** 1982. Polysaccharide fermentation in the human colon. In: *Colon and nutrition*. Falk Symposium 32, Kaper, H and Goebell, H., (eds.) M. T. P. Press, Lancaster, UK, 91-103.
- **Cummings, J. H., Macfarlane, G. T.,** 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in human colon: A review. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 443-459.
- **Demigne, C. R., Morand, C.,** 1990. Short Chain Fatty Acids: In: *Colonic microbiota, nutrition and health*. Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. (eds.) Dordrecht. The Netherlands, 56-68.
- **Drackley, J. K.,** 2001. Lipid metabolism. In: *DeiMello, J. P. F. (eds.), Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, 97-119.
- **Dréau, D., Lallés, J. P.,** 1999. Contribution to the study of gut hypersensitivity reaction to soybean proteins in preruminal calves and early-weaned piglets. *Livest. Prod. Sci.* 60 :209-218.
- **Drochner, W., Kerler, A., Zacharias, B.,** 2004. Pectin in pig nutrition, a comparative review. *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.* 88:367-380.

- **Duncan, S. H., Scott, K. P., Ramsay, A. G., Harmsen, H. J., Welling, G. W., Stewart, C. S., Flint, H. J., 2003.** Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1136-1142.
- **Dunsford, B. R., Haensly, W. E., Knabe, D. A., 1991.** Effects of diet on acidic and neutral goblet cell population in the small intestine of early weaned pigs. *Am. J. Vet. Res.* 52:1743-1746.
- **Falkowski, J. F., Aherne, F. X., 1984.** Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig nutrition. *J. Anim. Sci.* 58:935-938.
- **Ferraris, R. P., Yasharpur, S., Lloyd, K. C. K., Mirzayan, r., Diamond, J. M., 1990.** Luminal glucose concentration in the gut under normal condition. *Am. J. Physiol.* 259:G822-G837.
- **Forstner, J. F., Forstner, G. G., 1994.** Gastrointestinal mucus. In: Johnson L. R. (ed.), *Physiology of gastrointestinal tract*, Raven Press, New York, USA pp. 1255-1283.
- **Gabert, V. M., Sauer, W. C., 1994.** The effect of supplementing diets for weanling pigs with organic acids. A review. *J. Anim. Feed Sci.* 3:73-87.
- **Gálfi, P. And Bokori, J., 1990.** Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta. Vet. Hung.* 38(1-2):3-17.
- **Grieshop, C. M., Reese, D. E., Faley, G. C., 2001.** Non starch polysaccharides and oligosaccharides in swine nutrition. In: *Swine nutrition*, 2nd edition, 108-125.
- **Gugganbuhl, P., Séon, A., Piñón Quintana, A., Simões Nunes, C., 2007.** Effects of supplementation with benzoic acid (Vevo Vitall) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. *Livest. Sci.* 108:218-221.
- **Hampson, D. J., 1994.** Post-weaning *Escherichia coli* diarrhoea in pigs. In: C.L. Gyles (ed.) *Escherichia coli in domestic animals and humans*. CAB International, Oxon, USA, pp. 171-191.
- **Hansen, C. F., Riis, A. L., Bresson, S., Hojbjerg, O., Jensen, B. B., 2007.** Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of piglet stomach. *Livest. Sci.* 108:206-209.
- **Hodin, R. A., Shei, A., Meng, S., 1997.** Transcriptional activation of the human villin gene during enterocyte differentiation. *J. Gastrointest. Surg.* 1:433-438.
- **Hume, M. E., Corrier, D. E., Ivie, G. W., Delosch, J. R., 1993.** Metabolism of [¹⁴C] propionic acid in broiler chicks. *Poult. Sci.* 72:786-793.
- **Ichikawa, H., Shineha R., Satomi, S., Sakata, T., 2002.** Gastric or rectal instillation of short-chain fatty acids stimulates epithelial cell proliferation of small and large intestine in rats. *Dig. Dis. Sci.* 47:6-1141.
- **Jensen, B. B., Hojberg, O., Mikkelsen, L. L., Hedemann, M. S. and Canibe, N., 2003.** Enhancing intestinal function to treat and prevent intestinal disease. Vol. 1, 103-120. 9th Int. Symp. Dig. Physiol. Pigs, Banff, Canada. R. O. Ball, ed. Univ. Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- **Jiang, R., Chang, X., Stoll, B., Fan, M. Z., Arthington, J., Weaver, E., Campbell, J. and Burrin, D. G., 2000.** Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early-weaned pigs. *J. Nutr.* 130:12-26.

- **Jiang, T., and Savaiano, D. A.**, 1997. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. *Dig. Dis. Sci.* 42:2370-2377.
- **Jouany, J. P.**1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliments* 2:131-144.
- **Knochel, S. and Gould, G.**, 1995. Preservation microbiology and safety: quo vadis? *Trends Food Sci. Tech.* 6 :127-131.
- **Kutunia, A., Woliński, J., Laubitz, D., Jurkwska, M., Romé, V., Guilloteau, P., Zabielski, R.**, 2004. Effect of sodium butyrate on small intestine development in neonatal piglets feed artificial sow. *J. Physiol. Pharmacol. (Suppl. 55)* 2 :59-68.
- **Lallès J. P., Salmon, H.**, 1994. Effects of dietary antigens on health, performance and immune system of pigs at weaning. In: Souffrant W. B., Hagmeister H. (eds.), VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Bad-Doberan, Germany, EAAP Publication No. 80, Vol. 11, 295-307.
- **Lallès, J. P., Boudry, G., Favier, C., Le Floc'h, N., Luron, I., Montagne, L., P. Oswald, I., Pié., C., Séve, B.**, 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: Physiology: A review. *Aim. Res.* 53:301-316.
- **Levin, R.J.**, 1994. Digestion and absorption of carbohydrates from molecules and membranes to humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 59 :690S–698S.
- **Littell, R.C., Henry, P. R.**, Ammerman, C. B., 1998. Statistical analysis of repeated measure data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* Vol. 76, 1216.1231.
- **Lopes-Pedrosa, J. M., Torres, M. I., Fernandez, M. I., Rios, A., Gill, A.**, 1998. Severe malnutrition alters lipid composition and fatty acid profile of small intestine in newborn piglets. *J. Nutr.* 128:224-233.
- **Low, A. G., Zebrowska, T.**, 1989. Digestion in pigs. In: Bock, H. D., Eggum, B. O., Low, A. G., Simon, O., Zebrowska, T. (eds.), *Protein metabolism in Farm Animals*. Oxford University Press, Oxford, 54-109.
- **Macfarfale, G. T., Gibson, G. R., Beatty, E., Cumming, J. H.**, 1992. Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. *FEMS Microbiol. Ecol.* 161:81-88.
- **Macfarlane, S., Macfarlane, G. T., Cumming, J. H.**, 2006. Prebiotics in the gastrointestinal tract: a review. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 24:701-714.
- **Makkink, C. A., Negulescu, G. P., Guixin, Q., Verstagen, M. W. A.**, 1994. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejuna morphology in newly-weaned piglets. *Brit. J. Nutr.* 72:353-368.
- **Manzanilla, E. G., Nofrías, M., Anguita, M., Castillo, M., Perez, J. F., Martín-Orúe S. M., Kamel, C., Gassa J.**, 2006. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaning pigs. *J. Anim. Sci.* 84:51-2743.

- **Marion, J., Biernal, M., Thomas, F., Savary, G., Lebreton, Y., Zabielski, R., Le Huërou-Luron, I., Le Dividich, J.**, 2002. Small intestine growth and morphology in piglets weaned 7 days of age. Effect of level of energy intake. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:339-354.
- **Marion, J., Romé, V., M., Thomas, F., Savary, G., Le Huërou-Luron, I., Le Dividich, J.**, 2003. Weaning and feed intake alter pancreatic enzyme activities and corresponding mRNA levels in 7-d-old piglets. *J. Nutr.* 133:362-368.
- **Martin, L. J. M., Dumon, H. J. W., Lecannu, G., Champ, M. M. J.**, 2000. Potato and high-amylose maize starches are not equivalent producers of butyrate for the colonic mucosa. *Br. J. Nutr.* 84:689-696.
- **Matsumoto, S., Nanno M., Watanabe, N., Miyashita, M., Amasaki, H., Suzuki K. and Umesaki, Y.**, 1999. Physiological roles of $\gamma \delta$ T- cell receptor intraepithelial lymphocytes in cytoproliferation and differentiation of mouse intestinal epithelial cells. *Immunology* 97:18-25.
- **Mazzoni M., Lalatta Costerbosa, G., Casini, L., Petrosino, G., Trevisi, P., De Filippi, S., Bosi, P.**, 2004. La morfologia dello stomaco come parametro di valutazione dell'impiego di acidificanti nella dieta del suino in svezzamento. *Atti S. I. S. Vet.* 56, 240 (CD volume).
- **Mazzoni, M., Le Gall, M., De Filippi, Minieri S., L., Trevisi, P., Wolinski, J., Lalatta Costerbosa, Lallés, J. P., Guilloteau, P., Bosi, P.**, 2008. Supplemental sodium butyrate stimulates different gastric cell in weaned pigs. *J. Nutr.* 138:1426-1431.
- **McCracken, B. A., Spurlock, M. E., Ross, M.A., Zuckermann, F. A., Gaskins, H. R.**, 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J. Nutr.* 129:613-619.
- **Montagne, L., Pulske, J. R., Hampson, D. J.**, 2003. A review of interaction between dietary fibre and intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Sci. Technol.* 108:95-117.
- **Mroz, Z., Dekker, R. A., Koopmans, S. J., Le Huërou-Luron, I.**, 2003. Performance, functional features of the digestive tract and haematological indices in weaned piglets fed antibioticfree diets and exposed to a viro-bacterial infection. In: Ball R. O. (ed.), *Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, Banff, AB, Canada, 180-182.
- **Mroz, Z., Koopmans, S. J., Bannink, A., Partanen K., Krasucki, W., Overland, M., Radcliffe, S.**, 2006. Carboxylic acids as bioregulators and gut growth promoters in non-ruminants. In: Mosenthin R., Zebrowska T., (ed.) *Biology of the intestine*. Amsterdam: Elseviers, 81-133.
- **Nunez, M. C., Bueno, J. D., Ayudarte, M. V. A. A., Rios, A., Suarez, M. D., Gil, A.**, 1996. Dietary restriction induces biochemical and morphometric changes in small intestine of nursing piglets. *J. Nutr.* 126:933-944.
- **Nyachoti, C. M., De Lange, C. F. M., McBride, B.W., Schulze, H.**, 1997a. Significance of endogenous nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: a review. *Can. J. Anim. Sci.* 77:149-163.
- **Odgaard, R. L.**, 2001. Development in acidification of swine diets. In: *Proc. 37th Eastern Nutr. Conf.*, Halifax/Dartmouth (ed.), Nova Scotia, 17-22.

- **Overland, M., Granli, T., Kjos, N. P., Fjetland, O., Steien, S. H., Stokstad, M., 2000.** Effect of dietary formats on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 78:1875-1884.
- **Overland, M., Kjos, N. P., Borg, M., Sorum, H., 2007.** Organic acids in diets for entire male pigs. *Livest. Sci.* 109:170-173.
- **Partanen, K. H. and Mroz, Z., 1999.** Organic acids for performances enhancement in pigs diets. *Nutr. Res. Rev.* 12:117-145.
- **Perez de Rozas, A. M., Martin-Orúe S. M., Roca, M., Badiola I., Perez J. F., Campoy, S. and Barbé, J., 2004.** Characterization of the microbial diversity of pig intestinal tract by restriction fragment length polymorphism. *Reprod. Nutr. Dev.* 44 (Suppl. 1):S10.
- **Piva, A., Anfossi, P., Meola, E., Pietri, A., Panciroli, A., Bertuzzi, T., Formigoni, A., 1997.** Effect of microencapsulation on absorption process in swine. *Livest. Prod. Sci.* 51:53-61.
- **Piva, A., Morlacchini, M., Casadei, G., Gatta, P. P., Biagi, G., Prandini, A., 2002.** Sodium butyrate improves growth performance of weaned piglets during the first period after weaning. *Ital. J. Sci.* 1:35-41.
- **Piva, A., Casadei, G. Biagi, G., 2002a.** An organic acid blend can modulate swine intestinal fermentation and reduce microbial proteolysis. *Can. J. Anim. Sci.* 82:527-532.
- **Piva A., Grilli, E., Fabbri, L., Pizzamiglio, V., Campani, I., 2007.** Free versus microencapsulated organic acid in medicated or not medicated diet for piglets. *Livest. Sci.* 108:214-217.
- **Pluske, I. L., Williams, I. H., Aherne, F. X., 1995.** Nutrition of the neonatal pig. In: M. A. Varley (Ed.). *The Neonatal Pig. – Development and Survival*. CAB International, Oxon, USA, 187:235.
- **Pluske, J. R., Hampson D. J. and Williams I. H., 1997.** Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: A review. *Livest. Prod. Sci.* 51:215-236.
- **Podolak, R. K., Zayas, J. F., Kastner, C. L., Fung, D. Y. C., 1996.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. O157: H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59(4):370-373.
- **Roediger, W. E., 1980.** Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 21:793-798.
- **Russell, J. B., Diez-Gonzalez, F., 1998.** The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv. Microb. Physiol.* 39:205-234.
- **SAS, 1991.** Systems for Linear Models, 3th (ed.) SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
- **Scheppach, W., Dusel, G., Kuhn, T., Loges, C., Karch, H., Bartran, H. P., Richter, F., Christl, S. U. and Kasper, H., 1996.** Effect of L- glutamine and n- butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury. *Gut* 38:878-885.
- **Sengupta, S., Muir, J. G., Gibson, P. R., 2006.** Does butyrate protect from colorectal cancer? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21:209-18.
- **Spreeuwenberg, M. A. M., Verdonk, J. M. A. J., Gaskins, H.R., Verstegen, M.W. A., 2001.** Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs low feed intake at weaning. *J. Nutr.* 131:1520-1527.

- **Spreeuwenberg, M. A. M.**, 2002. Diet composition and gut integrity in weaned piglets. Ph. D. thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- **Stockes, C. R., Miller, B. G., Bailey, M., Wilson, A. D., Bourne, F. J.**, 1987. The immune response to dietary antigens and its influence on disease susceptibility in farm animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17:413-423.
- **Tang, M., Laaveld, B., VanKessel, A. G., Hamilton, D. L., Estrada, A., Patience, G. F.**, 1999. Effect of segregated early weaning on post-weaning small intestinal development in pigs. *J. Anim. Sci.* 77:3191-3200.
- **Thompson, J.L., Hinton, M.**, 1997. Antibacterial activity of formic acid and propionic acid in the diet of hens on salmonellas in the crop. *Br. Poult. Sci.* 38:59-65.
- **Torrellardona, D., Badiola, I., Broz, J.**, 2007. Effects of benzoic acid on performance and ecology of gastrointestinal microbiota in weanling piglets. *Livest. Sci.* 108 :210-213.
- **Trowell, H., Southgate, D.A. T., Wolever, T. M. S., Leeds, A. R., Gassull, M. A., Jenkins, D. J. A.**, 1976. Dietary fibre redefined, Vol 1. *The Lancet*, 967.
- **Tso, P.**, 1994. Intestinal lipid absorption. In: Johnson, L. R. (ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, 1867-1874.
- **Uzzau, S., Fasano, A.**, 2000. Cross-talk between enteric pathogens and the intestine. *Cell Microbiol.* 2:83-89.
- **Van Heugten, E., Spears, J. W., Kegley, E. B., Ward, J. D., Qureshi, M. A.**, 2003. Effects of organic forms of zinc on growth performance, tissue zinc distribution and immune response of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 81:2063-2067.
- **Van Immerseel, F., Fievez, V., de Buck, J., Pasmans, F., Martel, A., Haesebrouck, F., Ducatelle, R.**, 2004. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella enteritidis* in young chickens. *Poult. Sci.* 83:69-74.
- **Vente-Spreeuwenberg, M. A. M., Verdonk, J. M. A. J., Beynen, A.C. and Verstegen, M. W. A.**, 2003. Interrelationships between gut morphology and faeces consistency in newly weaned piglets. *Anim. Sci.* 77 :85-94.
- **Veum, T. L.**, 1991. Feeding neonatal pigs. In: *Swine Nutrition*. Butter-Worthheinemann. Cahp. 29:483-495.
- **Vissek, W. J.**, 1978, the mode of growth promotion by antibiotics. *J. Anim. Sci.* 46:1447-1469.
- **Walsh, M. C., Sholly, D. M., Hinson R. B., Saddores, K. L., Sutton, A. L., Radcliffe, J. S., Odgaard, R., Murphy, J., Richert, B. T.**, 2007. Effects of water and diet acidification with and without antibiotics on weanling pig growth and microbial shedding. *J. Anim. Sci.* 85:1799-1808.
- **Wang, J. F., Chen, X., Wang, Z. X., Dong, S. H., Lai, Z. W.**, 2005. Effect of sodium butyrate on the structure of the small intestine mucus epithelium of weaned piglets. *Chin. J. Vet. Sci. Technol.* 35:298-301.
- **Witte, W.**, 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science.* 13:996-997.
- **Xavier, R. J., Podolsky, D. K.**, 2000. How to get along-friendly microbes in the hostile world. *Science* 289:1483-1484.

- **Zhang, G., Ross, C. R., Blecha, F.**, 2000. Porcine anti-microbial peptides: new prospects for ancient molecules of host defence. *Vet. Res.* 31:277-296.
- **Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I. and Gaskins, H. R.**, 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *J. Nutr.* 134:465-472

